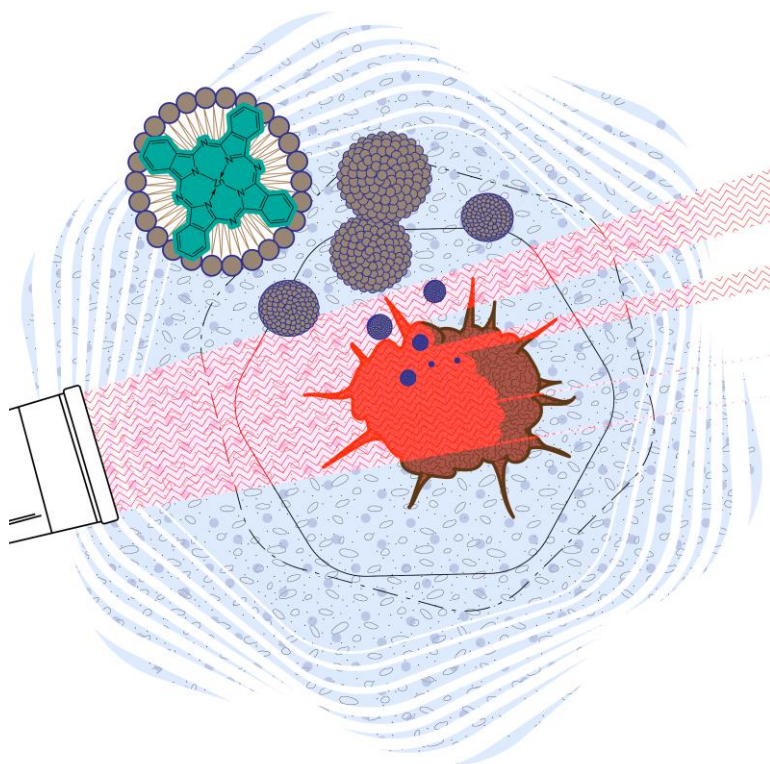




Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Departamento de Química Biológica
Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Propiedades antitumorales *in vitro* e *in vivo* de una ftalocianina de zinc(II) lipofílica para uso en terapia fotodinámica



Autor: Bioq. Nicolás Agustín Chiarante
Directora: Dra. Leonor Patricia Roguin
Directora Adjunta: Dra. Verónica Julieta Marino
2018

Agradecimientos

A la Dra. Leonor Roguin, directora de esta Tesis, por orientarme en el desarrollo de la línea experimental, por el apoyo para enfrentar nuevos desafíos, por su compromiso y dedicación con mi trabajo, por inculcarme una visión global.

A la Dra. Julieta Marino, directora adjunta de esta Tesis, por iniciarme en el trabajo experimental. Por su capacidad para repensar aquello que dábamos por sentado, por transmitirme su experiencia.

A mis compañeros de laboratorio. A la Dra. Viviana Blank por ayudarme cada vez que lo necesité, por formarme aunque no fuera su obligación. A la Dra. Verónica Furmento por guiarme en las vicisitudes de la vida del becario. Al Dr. Mariano Cárdenas, los Bioquímicos Yanina Bellizzi, Federico Valli, Celeste Gentilcore y la Lic. Elizabeth Barrionuevo por hacer del laboratorio un espacio alegre. A mis compañeros del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas “Dr. Alejandro C. Paladini” por su predisposición a cooperar con el otro.

A nuestros colaboradores, Dra. María Cecilia García Vior, Dra. Josefina Awruch, Lic. Sergio Ezquerria Riega, Dr. Osvaldo Rey y Dra. Elsa Zotta, por el respeto en el trabajo conjunto. A la Dra. Mariela Bollati-Fogolin por recibirme como pasante en su laboratorio del Instituto Pasteur de Montevideo. A la Dra. Tatiana Basika y la Lic. Hellen Daghero por su colaboración en los ensayos y hacer grata mi estadía en Uruguay.

A mis padres, Virginia y Fernando, por sus esfuerzos para que pudiera alcanzar mis objetivos, por su apoyo incondicional, por inculcarme los valores que me guían. A mi hermano, abuelos, primas y tíos por creer en mí.

A Leila, mi compañera en esta vida, por escucharme y aconsejarme. Por entenderme y darme fuerzas.

A la Universidad de Buenos Aires por permitir mi inserción en la ciencia mediante una Beca Estímulo. Al CONICET por el sustento para realizar esta Tesis. Al Estado Argentino por apoyar la investigación científica en nuestro país. A mis compañeros científicos con quienes nos planteamos repensar nuestra labor, nuestro rol y el de las instituciones de CyT en nuestra sociedad.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

López Zeballos N.C., Marino J., García Vior M.C., **Chiarante N.**, Roguin L.P., Awruch J., Dixelio L.E. (2013) Photophysics and photobiology of different liposomal formulations of 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[(2dimethylamino)ethylsulfanyl] phthalocyaninato-zinc(II). *Dyes Pigments* 96, 626-635.

Chiarante N., García Vior M.C., Awruch J., Marino J., Roguin L.P. (2017) Phototoxic action of a zinc(II) phthalocyanine encapsulated into poloxamine polymeric micelles in 2D and 3D colon carcinoma cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 170, 140-151.

Chiarante N., García Vior M.C., Rey O., Marino J., Roguin L.P. (2018) Lysosomal permeabilization and endoplasmic reticulum stress mediate the apoptotic response induced after photoactivation of a lipophilic zinc(II) phthalocyanine. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 103, 89-98.

Asimismo, durante el período de la Tesis se publicaron los siguientes trabajos:

Ezquerria Riega S.D., **Chiarante N.**, Valli F., Marino J., Roguin L.P., Awruch J., García Vior M.C. (2018) Novel hydro- and lipo-philic selenium zinc(II) phthalocyanines: Synthesis, photophysical properties and photodynamic effects on CT26 colon carcinoma cells. *Dyes and Pigments* 156, 133-139.

Abreviaturas y símbolos

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
λ	Longitud de onda
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
3-MA	3-metiladenina
5-FU	5-fluoruracilo
Ac-LEHD-AMC	Ac-Leu-Glu-His-Asp 7-amino-4-metilcumarina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFC	7-Amino-4-trifluorometilcumarina
AJCC	Comité Americano Conjunto del Cáncer (del inglés <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
ALT	Alanina aminotransferasa
AMC	7-Amino-4-metilcumarina
ANOVA	Análisis de la varianza
Apaf-1	Factor-1 activador de proteasas apoptóticas
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-aminofenoxi)-etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético tetra-(acetoximetil) éster
BHL	Balance hidrofílico-lipofílico
CA-074 Me	(L-3-trans-(Propilcarbamoil)oxirano-2-carbonil)-L-isoleucil-L-prolina metil éster
CapeOX	Capecitabina + Oxaliplatino
CARD	Dominio de activación y reclutamiento de caspasas
CCR	Cáncer colorrectal
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CHOL	Colesterol adecuado para cultivo celular
CMC	Concentración micelar crítica
cPLA2	Fosfolipasa A2 dependiente de calcio
CQ	Cloroquina (sal difosfato)
DABCO	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato

DiOC6(3)	Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina
DISC	Complejos de señalización inductores de muerte (del inglés <i>death-inducing signaling complex</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE	1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPE-PEG	L- α -Fosfatidiletanolamina diestearoil metoxipolietilenglicol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético
EPR	Efecto de permeabilidad y retención aumentada (del inglés <i>Enhanced permeability and retention effect</i>)
ER	Retículo endoplásmico
ERAD	Degradación de proteínas asociadas al RE (del inglés <i>ER-associated protein degradation</i>)
ES	Error estándar
ESI	Ionización por electroespray
FADD	Proteína asociada a Fas con dominio de muerte (del inglés <i>Fas-associated protein with death domain</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de E.E.U.U. (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLOX	Leucovorina + 5-FU + Oxaliplatino
FOLFIRI	Leucovorina + 5-FU + Irinotecan
FOLFOX	Leucovorina + 5-FU + Oxaliplatino
FS	Fotosensibilizador
FSs	Fotosensibilizadores
HEPES	Buffer ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico]
Höesch	33258 Bisbencimida
HPPH	2-(1-hexiloxietil)-2-devinilpiro feoforbido-a
Hsp90	<i>Heat-shock protein</i> 90
Hsp110	<i>Heat-shock protein</i> 110
ICT	inhibición porcentual del crecimiento tumoral
IP	Ioduro de propidio
IR	Infrarrojo
IRCT	índice de retraso en el crecimiento tumoral

IT	Intratumoral
kDa	Kilodalton
LC3II	Proteína asociada a microtúbulo 1A/1B cadena liviana 3B
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MHB	Buffer Hank's modificado
MME	Membrana mitocondrial externa
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAC	N-acetil-L-cisteína
N _{EO}	Número promedio de monómeros de etilenóxido por bloque de polietilenóxido
N _{PO}	Número promedio de monómeros de propilenóxido por bloque de polipropilenóxido
OX	Oxaliplatino
p.i.	Post-irradiación
PARP-1	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	Buffer fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,40
Pc	Ftalocianina
Pc9	Ftalocinina 9
Pc11	Ftalocinina 11
Pc12	Ftalocinina 12
Pc13	Ftalocinina 13
Pcs	Ftalocianinas
PCEY	L- α -Fosfatidilcolina de yema de huevo Tipo XVI-E
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PD 150606	3-(4-yodofenil)-2-mercapto-(Z)-2-propenoico ácido
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PEEY	L- α -Fosfatidiletanolamina de yema de huevo Tipo III
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAB	Seroalbúmina bovina
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero fetal bovino
T304	Tetronic 304 ®
T904	Tetronic 904 ®
T1107	Tetronic 1107 ®
T1307	Tetronic 1307 ®
TBS-T	Buffer Tris 10 mM, NaCl 130 mM, Tween 20 0,05% V/V, pH 7,40
TD	Tiempo de duplicación
TFD	Terapia fotodinámica
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF α R	Receptor del factor de necrosis tumoral alfa
TOF	<i>Time of flight</i>
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociada al receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 (del inglés <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain</i>).
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UICC	Unión Internacional para el Control del Cáncer (del inglés <i>Union for International Cancer Control</i>)
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	<i>Western blot</i>
Z-IETD-AFC	Z-Ile-Glu-Thr-Asp 7-amino-4-trifluorometilcumarina

Índice

Capítulo 1. Introducción

1.1. Cáncer.....	1
1.1.1. Definiciones y características generales.....	1
1.1.2. Bases moleculares.....	1
1.1.2.1. Ciclo celular.....	1
1.1.2.2. Alteraciones que dan lugar a tumores.....	3
1.1.2.3. Pasos de la carcinogénesis.....	4
1.1.3. Clasificaciones.....	5
1.1.4. Mecanismos de muerte de células tumorales.....	7
1.1.4.1. Apoptosis.....	8
1.1.4.2. Autofagia.....	12
1.1.4.3. Necrosis.....	15
1.1.4.4. Otros mecanismos.....	15
1.1.5. Modelos experimentales para ensayos preclínicos en oncología.....	16
1.1.5.1. Cultivos bidimensionales.....	17
1.1.5.2. Cultivos tridimensionales.....	17
1.1.5.3. Modelos <i>in vivo</i>	19
1.1.6. Carcinoma colorrectal.....	21
1.1.6.1. Definiciones y características.....	21
1.1.6.2. Epidemiología.....	25
1.1.6.3. Tratamientos disponibles.....	26
1.1.6.4. Aproximaciones experimentales a la investigación del carcinoma colorrectal.....	29
1.1.6.4.1. Modelos <i>in vitro</i>	29
1.1.6.4.2. Modelos <i>in vivo</i>	30
1.2. Terapia fotodinámica.....	32
1.2.1. Definición y fundamento físico.....	34
1.2.2. Antecedentes.....	35
1.2.3. Aplicaciones y perspectivas.....	37
1.2.4. Ventajas comparativas para su uso en oncología.....	37
1.3. Fotosensibilizadores	37
1.3.1. Características de un fotosensibilizador ideal.....	37
1.3.2. Fotosensibilizadores en uso en Terapia Fotodinámica.....	38

1.3.3. Ftalocianinas y sus aplicaciones.....	38
1.3.4. Ftalocianinas de zinc(II).....	39
1.4. Medios de vehiculización: micropartículas y sistemas nanotecnológicos.....	41
1.4.1. Tipos de medios de vehiculización.....	41
1.4.2. Aplicaciones en oncología.....	43
1.4.3. Liposomas.....	43
1.4.4. Micelas.....	46

Objetivos

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales.....	51
2.1.1. Reactivos.....	51
2.1.2. Ftalocianina 9.....	52
2.1.3. Micropartículas y sistemas nanotecnológicos.....	52
2.1.3.1. Liposomas unilamelares.....	52
2.1.3.2. Micelas de poloxamina.....	53
2.1.4. Líneas celulares.....	55
2.2. Métodos.....	55
2.2.1. Ensayos <i>in vitro</i> en cultivos bidimensionales.....	55
2.2.1.1. Determinación de la proliferación celular y la potencia citotóxica.....	55
2.2.1.2. Estimación de captación y liberación celular de Pc9.....	57
2.2.1.3. Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno.....	58
2.2.1.4. Localización subcelular.....	59
2.2.1.5. Microscopía de fluorescencia.....	59
2.2.1.6. Obtención de la fracción citosólica para inmunodetección de Catepsina D.....	60
2.2.1.7. Obtención de lisados totales de cultivos bidimensionales para <i>Western-Blot</i>	60
2.2.1.8. Ensayos de <i>Western-Blot</i>	61
2.2.1.8.1. Estimación de la concentración de proteínas.....	61
2.2.1.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	61
2.2.1.8.3. Electrotransferencia a membranas	

de difluoruro de polivinilideno e inmunodetección.....	61
2.2.1.9. Determinación de los niveles intracelulares de calcio.....	62
2.2.1.10. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	62
2.2.1.11. Determinación de la actividad de caspasas.....	63
2.2.1.12. Microscopía óptica.....	63
2.2.1.13. Determinación del contenido de ADN y análisis del ciclo celular.....	63
2.2.2. Ensayos <i>in vitro</i> en cultivos tridimensionales.....	64
2.2.2.1. Obtención de esferoides.....	64
2.2.2.2. Determinación de la proliferación celular y la potencia citotóxica.....	64
2.2.2.3. Estimación del volumen de los esferoides.....	65
2.2.2.4. Microscopía de fluorescencia.....	65
2.2.2.5. Obtención de lisados totales de cultivos tridimensionales para <i>Western-Blot</i>	65
2.2.3. Ensayos <i>in vivo</i>	66
2.2.3.1. Animales.....	66
2.2.3.2. Incorporación de Pc9 en el tumor.....	66
2.2.3.3. Determinación del tamaño de la muestra.....	67
2.2.3.4. Modelo tumoral murino.....	67
2.2.3.5. Evaluación del volumen tumoral.....	69
2.2.3.6. Cálculo de parámetros matemáticos indicadores de la eficacia de un tratamiento antitumoral.....	69
2.2.3.7. Ensayo de sobrevivencia.....	69
2.2.3.8. Determinación de toxicidad sistémica.....	70
2.2.3.9. Determinación de toxicidad hepática	70
2.2.3.10. Evaluación de alteraciones histológicas en tejidos y tumores mediante microscopía óptica.....	71
2.2.3.11. Inmunofluorescencia.....	71
2.2.3.12. Obtención de lisados totales tumorales para <i>Western-Blot</i>	71
2.2.4. Análisis estadístico.....	71

Capítulo 3. Resultados: Evaluación de la citotoxicidad de Pc9 en diferentes vehículos.

3.1. Citotoxicidad de Pc9 disuelta en DMSO-agua.....	73
3.2. Liposomas.....	73

3.2.1. Efecto de los liposomas sobre la proliferación celular.....	74
3.2.2. Efecto citotóxico de Pc9 vehiculizada en liposomas.....	75
3.2.3. Generación de ROS y localización subcelular de combinaciones liposoma-Pc9.....	77
3.3. Micelas.....	80
3.3.1. Efecto de las micelas sobre la proliferación celular.....	80
3.3.2. Efecto citotóxico de Pc9 vehiculizada en micelas.....	81
3.3.3. Localización subcelular de Pc9-T1107.....	82
3.4. Discusión.....	83

Capítulo 4. Resultados: Mecanismo de acción de Pc9-T1107 en cultivos celulares bidimensionales.

4.1. Efecto de la micela T1107 sobre la viabilidad de las células CT26.....	90
4.2. Citotoxicidad de Pc9-T1107.....	91
4.2.1. Citotoxicidad de Pc9-T1107 según su concentración.....	91
4.2.2. Citotoxicidad de Pc9-T1107 según la energía lumínica.....	93
4.2.3. Citotoxicidad de Pc9-T1107 a diferentes tiempos post-irradiación.....	94
4.3. Captación y liberación celular de Pc9-T1107.....	94
4.3.1. Captación celular de Pc9-T1107 según tiempo de incubación.....	95
4.3.2. Captación celular de Pc9-T1107 según la concentración del fotosensibilizador.....	96
4.3.3. Liberación de Pc9-T1107 en función del tiempo.....	96
4.4. Niveles de ROS y muerte celular.....	97
4.4.1. Generación de ROS.....	97
4.4.2. Efecto de antioxidantes sobre la viabilidad celular.....	98
4.5. Localización subcelular de Pc9.....	101
4.6. Permeabilización de membranas lisosomales.....	102
4.6.1. Tinción con naranja de acridina.....	102
4.6.2. Niveles citoplasmáticos de Catepsina D.....	105
4.6.3. Niveles de Hsp70.....	106
4.7. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la acción fototóxica de Pc9-T1107.....	107
4.8. Estrés de retículo endoplásmico.....	109
4.8.1. Niveles de expresión de chaperonas.....	109
4.8.2. Niveles de calcio intracelular y su participación en el proceso de muerte.....	109
4.9. Despolarización de membranas mitocondriales.....	114

4.10. Niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2.....	116
4.11. Análisis del rol de las calpaínas en el proceso de muerte.....	117
4.12. Activación de caspasas.....	118
4.12.1. Niveles de procaspasa 3.....	118
4.12.2. Actividad de caspasa 3, 8 y 9.....	119
4.12.3. Niveles de procaspasa 12 y su relación con calpaínas.....	120
4.13. Evaluación del rol de Catepsina D.....	121
4.14. Alteraciones en morfología celular.....	123
4.15. Alteraciones en la morfología nuclear.....	123
4.16. Determinación del porcentaje de células hipodiploides.....	125
4.17. Análisis de niveles de PARP-1.....	126
4.18. Evaluación del ciclo celular.....	127
4.19. Efecto de inhibidores de autofagia sobre la acción fototóxica de Pc9-T1107.....	128
4.20. Discusión.....	129

Capítulo 5. Resultados: Efecto de Pc9-T1107 en cultivos celulares tridimensionales y en un modelo *in vivo* de carcinoma de colon.

5.1. Efecto de Pc9-T1107 sobre cultivos celulares tridimensionales.....	140
5.1.1. Citotoxicidad y potencia de Pc9-T1107.....	140
5.1.2. Alteraciones en el volumen del esferoide.....	141
5.1.3. Inducción de una respuesta apoptótica.....	143
5.1.3.1. Alteraciones en morfología nuclear.....	143
5.1.3.2. Efecto sobre niveles de procaspasa 3.....	143
5.2. Efecto de Pc9-T1107 en un modelo <i>in vivo</i> de carcinoma de colon.....	144
5.2.1. Incorporación de Pc9 en el tumor.....	144
5.2.2. Efecto antitumoral <i>in vivo</i> de Pc9-T1107.....	146
5.2.2.1. Inhibición del crecimiento tumoral.....	147
5.2.2.2. Parámetros matemáticos.....	148
5.2.2.3. Ensayo de sobrevivencia en ratones.....	150
5.2.3. Evaluación de la toxicidad de Pc9-T1107.....	151
5.2.3.1. Peso total de los animales.....	151
5.2.3.2. Análisis histológico de diversos tejidos.....	152
5.2.3.3. Toxicidad hepática.....	153
5.2.3.3.1. Actividad de enzimas hepáticas.....	154
5.2.3.3.2. Peso del hígado relativo al peso total del animal....	154

5.2.4. Mecanismo de acción antitumoral de Pc9-T1107 <i>in vivo</i>	155
5.2.4.1. Niveles del antígeno nuclear de proliferación celular.....	155
5.2.4.2. Análisis histológico de cortes de tumores.....	156
5.2.4.3. Participación de miembros de la familia Bcl-2, PARP-1 y caspasa 3.....	157
5.3. Discusión.....	159

Resumen

Bibliografía

Capítulo 1

Introducción

1.1. Cáncer.

1.1.1. Definiciones y características generales.

Cáncer es un término genérico utilizado para un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento de células anormales que se dividen en forma descontrolada. Estas células pueden invadir tejidos circundantes e incluso órganos distantes mediante un proceso denominado metástasis. Esta patología puede afectar casi cualquier parte del cuerpo humano, por lo que existen variados subtipos anatómicos y moleculares. Mientras que en varones los más prevalentes son los de pulmón, próstata, estómago, hígado y colorrectal, en mujeres predominan los mamarios, colorrectales, pulmonares, cervicales y de estómago. Cada uno de estos subtipos requiere de una estrategia terapéutica particular (*World Health Organization*, 2018).

Los principales factores de riesgo incluyen obesidad, tabaquismo, consumo de alcohol y dieta rica en carnes rojas y grasas pero pobre en frutas y vegetales (Willett W.C., 2001a; Willett W.C., 2001b). La incidencia del cáncer también se asocia con la edad (Basu A.K., 2018).

Los tumores malignos representan la segunda causa de muerte a nivel global, contabilizando 8,8 millones de muertes en 2015. Es decir, 1 de cada 6 muertes a nivel global son a causa del cáncer, mientras que el 70% de las defunciones corresponden a países de ingresos bajos o medios (*World Health Organization*, 2018).

A nivel celular, el cáncer se caracteriza por una serie de eventos característicos (*hallmarks*) o propiedades específicas distintivas que posibilitan el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. Si bien inicialmente se identificaron seis particularidades de esta patología (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2000), posteriormente se agregaron otras dos más (Hanahan D. y Weinberg R.A., 2011). En consecuencia, al día de hoy se considera que los rasgos distintivos del cáncer son: i) señalización proliferativa sostenida, ii) insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento, iii) resistencia a la muerte celular, iv) potencial ilimitado de replicación, v) inducción de angiogénesis, vi) activación de la invasión de tejido y metástasis, vii) reprogramación del metabolismo energético y viii) evasión de la destrucción por parte del sistema inmune.

1.1.2. Bases moleculares

1.1.2.1. Ciclo celular

Las células, ya sea de un organismo unicelular o de un organismo complejo, pueden encontrarse en dos modalidades: en la fase denominada G0 o bien atravesando el ciclo celular.

Las células en fase G0, a diferencia de aquellas que se encuentran atravesando el ciclo celular, no se encaminan en lo inmediato hacia un proceso de división celular (Alberts B.,

2014a). Estas células son metabólicamente activas aunque presentan tamaño disminuido y menor síntesis de nucleótidos. Las células en G0 o quiescentes pueden eventualmente reincorporarse al ciclo celular si las condiciones nutricionales son óptimas o si se ha reparado el daño que las llevó a salir del ciclo (Lemons J.M.S. y col., 2010).

Las células toman la decisión de incorporarse al ciclo o entrar en fase G0 mediante un mecanismo conocido como “control del punto de restricción” (Dalton S. y Coverdell P.D., 2015). El ciclo celular es una secuencia de eventos altamente regulados mediante la cual las células replican su contenido (proteínas, lípidos, ADN, ARN, etc) para finalmente dividirse en dos células hijas (Figura 1.1). Este proceso se divide en cuatro etapas: G1, S, G2 y M (Araki T. y Liu N., 2018; Basu A.K., 2018). La fase G1 es la inmediatamente posterior a la mitosis (M) y se caracteriza como una etapa de preparación para la fase siguiente (S). La célula aumenta su tamaño y produce nuevo material citoplasmático (proteínas y ARN principalmente) necesario para la síntesis de ADN (Alberts B., 2014b). Durante la fase S, se replica en su totalidad el material genético, que posteriormente se distribuirá entre las células hijas. A continuación, las células atraviesan la fase G2 que es una nueva fase preparatoria, en este caso para la fase M. Esta etapa se caracteriza por una marcada producción de proteínas citoplasmáticas, ARN y organelas. Las tres etapas previamente mencionadas (G1, S y G2) se agrupan bajo el nombre de “Interfase”. Durante la mitosis, las macromoléculas generadas previamente se organizan espacialmente de forma que al producirse la división celular se originan dos células hijas iguales. Posteriormente, las células en proliferación vuelven a entrar en fase G1 y se disponen nuevamente a atravesar el ciclo celular. En su conjunto, este proceso se encuentra finamente regulado por un grupo de proteínas, entre las cuales se destacan las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Meeran S.M. y Katiyar S.K., 2008; Solaki M. y Ewald J.C., 2018). Estas proteínas son responsables de permitir la progresión a través del ciclo, lo cual depende de las condiciones ambientales y del estado propio de cada célula. La maquinaria de replicación debe asegurarse de que el proceso transcurra en forma correcta, para lo cual evalúa una serie de parámetros (Alberts B., 2014a). Entre ellos se encuentran la correcta duplicación del ADN y segregación de los cromosomas. Frente a alteraciones en estas etapas, la célula cuenta con diversos mecanismos de reparación del ADN para subsanar el daño. La falla en estos mecanismos supresores de la proliferación o de reparación del material genético puede dar lugar a células tumorales, como se explicará en la próxima sección.

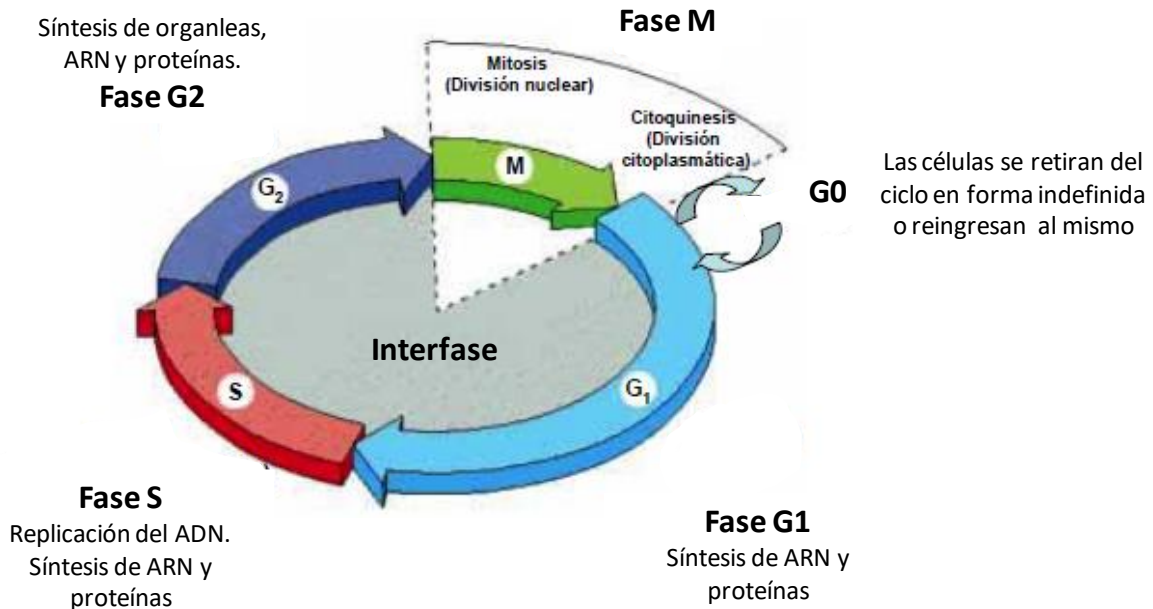


Figura 1.1. Fases del ciclo celular. La célula luego de la mitosis escapa del ciclo celular hacia la fase G0 o bien vuelve a atravesar el ciclo, entrando en fase G1. Durante esta fase se sintetizan diversas macromoléculas necesarias para la fase S, en la que se duplica el material genético. Durante la fase G2 se producen proteínas, ARN y organelas. Finalmente, la célula entra en mitosis para dar lugar a dos células hijas. Figura adaptada de Alberts B. y col., 2002 y Weinberg R.A., 2007.

1.1.2.2. Alteraciones que dan lugar a tumores

Diversos factores pueden producir daño en el ADN generando alteraciones en los procesos normales de proliferación y muerte celular. Una proliferación exacerbada o niveles de muerte celular inferiores a los normales pueden desencadenar el crecimiento descontrolado de un grupo de células que dan lugar a la formación de una masa tumoral (Foster I., 2008). Estos factores pueden ser mutagénicos e incluir agentes químicos, virus, radiaciones ultravioletas y otros, si bien también existe la posibilidad de que las mutaciones se den en forma espontánea o que cuenten con un componente hereditario (Basu A.K., 2018; Gold B., 2017). En humanos, ya se han identificado más de 350 genes relacionados con el desarrollo tumoral. Depende del tipo de tumor qué mutaciones son más frecuentes y cuántas mutaciones son necesarias para la aparición de una masa tumoral. Los principales genes involucrados en los procesos carcinogénicos son los denominados proto-oncogenes, genes supresores de tumores y aquellos relacionados con la reparación del ADN.

Los proto-oncogenes, como *HER2*, pueden generar mediante distintos mecanismos oncogenes que median una proliferación descontrolada (Ferguson L.R., 2009; Basu A.K., 2018). Esto se debe a que los oncogenes codifican para proteínas que intervienen en vías de señalización relacionadas con la supervivencia o la división celular. También codifican para

proteínas que actúan ya sea como factores de crecimiento o sus receptores, o bien como factores de transcripción.

Como su nombre lo indica, los genes supresores de tumores normalmente evitan la proliferación celular descontrolada (Ferguson L.R., 2009; Basu A.K., 2018). Realizan esta función al monitorear la división celular, reparar ADN dañado y controlar la muerte celular. Por ende, las modificaciones que se produzcan en los mismos pueden inhibir esta función y por consiguiente propiciar la tumorigénesis. Ejemplos de estos genes son *BRCA1*, *BRCA2* y *p53*. Mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama o de ovario de tipo hereditario. Por otro lado, en más del 50% de los cánceres en humanos se presentan mutaciones en *p53*, gen conocido como “guardián del genoma”, responsable de detener el ciclo celular frente a daños a nivel del ADN.

1.1.2.3. Pasos de la carcinogénesis

En su conjunto, las alteraciones previamente mencionadas pueden corresponder al paso de iniciación de la carcinogénesis. Actualmente, se identifica que el proceso que lleva a la generación de un tumor maligno se compone de tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 1.2). Los agentes iniciadores mutagénicos previamente mencionados (moléculas químicas, radiación, virus, etc) llevan a la carcinogénesis ya sea luego de varias exposiciones a dosis bajas o tras una única exposición a una dosis alta (Basu A.K., 2018). El efecto de los mismos es aditivo e irreversible, e implica la unión o daño a macromoléculas intracelulares como el ADN.

Por su parte, los agentes promotores no son carcinogénicos *per se*, pero promueven el desarrollo tumoral una vez que ha tenido lugar la iniciación. No existe evidencia de que se unan covalentemente a blancos celulares específicos y su efecto es reversible en etapas tempranas, aunque pueden provocar inestabilidad genética generando alteraciones cromosomales. La mayor parte del conocimiento acerca de este proceso proviene de experimentos realizados en piel de ratón (Kemp C.J., 2015). Durante la promoción se inducen una serie de cambios a nivel epigenético como, por ejemplo, la activación de la decarboxilasa ornitina, que lleva a la síntesis de poliaminas (Fujiki H. y col., 1981; Fujiki H. y Sugimura T., 1987; DiGiovanni J., 1992). Esta familia de moléculas, que incluye a la espermina y la espermidina, promueve la proliferación celular por distintas vías, como la inhibición del daño generado por óxido nítrico (Babbar N. y Gerner E.W., 2011) o la capacidad de modular las interacciones ADN-proteínas (Thomas T. y Thomas T.J., 2001). Las consecuencias de la exposición a ciertos promotores ha sido descripta en detalle. En el caso de los ésteres de forbol, estos pueden activar proteínas de membrana, como la proteína quinasa C (Castagna M. y col., 1982). Por otro lado, el peróxido de benzoilo desencadena mecanismos oxidativos que llevan a la fosforilación de proteínas, como

STAT3 en su serina 727, favoreciendo así el crecimiento tumoral (Gopalakrishna R. y col., 2008).

Hasta ahora nos hemos referido a tumores benignos. Estas masas de células no poseen la capacidad de invadir tejido adyacente, es decir que crecen en forma restringida al sitio anatómico donde se originan. Mediante el proceso de progresión, un tumor benigno da lugar a un tumor maligno, que sí posee la capacidad de invadir tejidos circundantes y producir metástasis (Vogelstein B. y col., 1988). Esto se ve posibilitado tanto por alteraciones genéticas y epigenéticas de las células tumorales como por modificaciones en el normal funcionamiento de células estromales no tumorales que contribuyen a la generación de un microambiente que facilita la invasión del tumor y su posterior metástasis (Valastyan S. y Weinberg R.A., 2011). Los complejos eventos biológicos que se desarrollan durante la cascada invasión-metástasis se dividen en siete etapas: i) invasión local, proceso en el cual las células tumorales colonizan tejido vecino de otro tipo; ii) pasaje hacia el torrente sanguíneo; iii) transporte a través de la vasculatura, formando agregados de las células tumorales con plaquetas para así evadir el sistema inmune; iv) anclaje en un sitio distante del torrente sanguíneo, determinado por la plasticidad propia de la célula tumoral o las posibles interacciones moleculares con cada tejido específico; v) extravasamiento fuera de la vasculatura hacia el tejido donde se generará el nuevo tumor; vi) supervivencia inicial en el tejido donde se produce metástasis, y vii) reinicio de la proliferación.

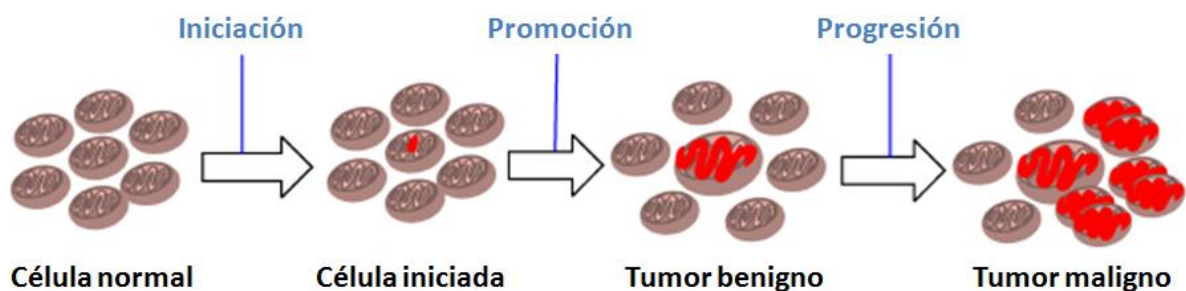


Figura 1.2. Proceso carcinogénico. La formación de un tumor maligno es consecuencia de la sucesión de varias etapas (iniciación, promoción y progresión). Figura adaptada de Basu A.K., 2018.

1.1.3. Clasificaciones.

En la actualidad, existen alrededor de 200 tipos de cánceres (*National Cancer Institute at National Institute of Health*, EEUU). Si bien hay excepciones, el principal determinante para la clasificación es el órgano en el que se localiza primariamente el tumor (Song Q. y col., 2015). A partir de esta clasificación se desprenden otras que tienen en cuenta el tipo celular de origen, la edad del paciente, la expresión de ciertos tipos de receptores hormonales, etc.

En consecuencia, estos 200 tipos iniciales de tumores se multiplican en miles de subtipos, cantidad que se ve constantemente acrecentada debido a nuevas herramientas como la epigenética y las “ómicas”. La correcta y detallada clasificación de los subtipos tumorales resulta esencial para identificar la patología de cada paciente y avanzar en una estrategia de medicina personalizada que maximice la capacidad terapéutica (Levy M.A. y col., 2012; Weitzel J.N. y col., 2011).

Una herramienta ampliamente utilizada para la clasificación de tumores es el sistema TNM del Comité Americano Conjunto del Cáncer (AJCC, del inglés *American Joint Committee on Cancer*) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC, del inglés *Union for International Cancer Control*). La sigla TNM se interpreta como “tamaño del tumor

Tabla 1.1. Clasificación tumoral según sistema TNM.

T		N		M	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado	Nx	Los nódulos linfáticos vecinos no pueden ser evaluados	M0	No existe metástasis distante (el cáncer no se ha expandido a otras partes del organismo)
T0	No existe evidencia de tumor primario				
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (cáncer temprano que no se ha extendido a tejido vecino)	N0	No se encuentran involucrados los nódulos linfáticos vecinos	M1	Existe metástasis distante (el cáncer se ha expandido a otras partes del organismo)
T1 - T4	Tamaño o extensión de tumor primario	N1 - N3	Se encuentran involucrados los nódulos linfáticos vecinos (número o extensión de la invasión)		

- nódulos linfáticos - metástasis”, ya que la clasificación tumoral se realiza luego de examinar estos tres parámetros, como se detalla en la Tabla 1.1. Más allá de este formato general, cada tipo de cáncer cuenta con un sistema de clasificación propio, por lo que los

números y letras que se agregan no significan siempre lo mismo. Teniendo en cuenta la clasificación TNM realizada, cada tumor se asocia con un estadio que puede variar entre 0, I, II, III y IV. En algunos tipos tumorales, algunas etapas pueden estar subdivididas usando letras, como por ejemplo IIIA y IIIB. En ciertos casos, son necesarios factores no anatómicos particulares para determinar el pronóstico. Mientras que el estadio 0 representa el menor grado de avance de la enfermedad o el que tiene un mejor pronóstico, cuanto mayor es el estadio más grave es la patología. En base a esta clasificación se realizan las Guías de Práctica Clínica en las que se detalla el algoritmo de tratamiento para cada estadio de cada tipo tumoral.

1.1.4. Mecanismos de muerte de células tumorales.

Las modalidades de muerte que pueden atravesar las células tumorales son diversas y dependen de una serie de factores, como tipo de injuria, origen de la misma, tipo celular, dosis administrada, etc. Estas modalidades o mecanismos han sido divididos entre aquellos regulados (que pueden ser modulados) y aquellos accidentales (no se pueden prevenir y no involucran una maquinaria específica). Entre los más estudiados se identifican la apoptosis, la autofagia y la necrosis, mientras que otros procesos como paraptosis, necroptosis, piroptosis y ferroptosis, entre otros, han sido descritos en los últimos tiempos. Cabe mencionar que la aparición de uno de estos procesos no excluye la posibilidad de que al mismo tiempo se esté desarrollando otro, por lo que las respuestas celulares a los tratamientos antineoplásicos han demostrado ser más complejas de lo que inicialmente se pensó (Abrahamse H. y col., 2017). Las características distintivas más importantes de algunos de los procesos de muerte celular se esquematizan en la Figura 1.3. Brevemente, las células apoptóticas se caracterizan por una disminución del tamaño celular, la aparición de ampollas o protuberancias en la membrana (*blebbing*), la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. En el proceso de autofagia, en cambio, se observa acumulación de autofagosomas y autofagolisosomas que median la degradación de organelas y proteínas. La necrosis, por su parte, se distingue por el aumento del tamaño celular y el daño temprano en la membrana plasmática.

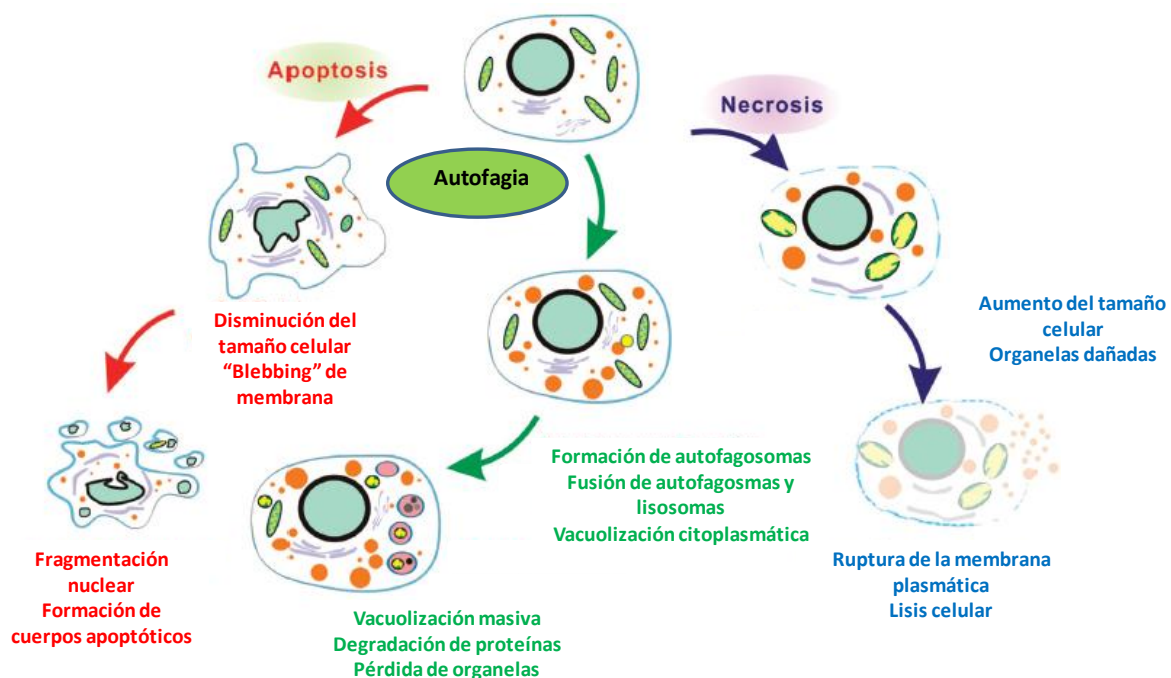


Figura 1.3. Características morfológicas de la apoptosis, autofagia y necrosis. Figura adaptada de Tan C. y col., 2014.

1.1.4.1. Apoptosis.

Este mecanismo de muerte, ampliamente conservado, fue identificado por primera vez como consecuencia de la aplicación de terapia fotodinámica (TFD) en 1991 (Agarwal M.L. y col., 1991). Es un tipo de muerte que no genera inflamación, ya que los componentes de la células se van incorporando en vesículas (llamadas cuerpos apoptóticos) recubiertas por membrana plasmática. Así, se limita la cantidad de alarminas o señales de peligro (también conocidas como patrones moleculares asociados al daño, DAMPs) que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria al ser liberadas.

A nivel molecular, existen principalmente dos mecanismos a través de los cuales se puede desencadenar la apoptosis: la vía extrínseca, mediada por receptores de muerte, y la intrínseca, mediada por mitocondrias. En ambas intervienen caspasas, cisteín-proteasas responsables del clivaje de numerosas proteínas y de los cambios morfológicos sufridos por las células.

La vía extrínseca se caracteriza por la unión de ligandos a receptores de muerte en la membrana celular. Algunos de estos receptores son Fas, TNF α R y DR5, siendo sus respectivos ligandos FasL, TNF α y TRAIL. Como consecuencia de la interacción entre ambas moléculas, los receptores se oligomerizan y forman *clusters* o agregados que dan lugar a los llamados "complejos de señalización inductores de muerte" (DISC, del inglés *death-inducing signaling complex*), los cuales reclutan y activan la proforma de caspasa 8 (procaspasa 8). Dentro de estos complejos cumplen un rol central proteínas adaptadoras

que se asocian a los receptores, como FADD (del inglés *Fas-associated protein with death domain*) y TRADD (del inglés *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain*). Existen mecanismos alternativos para la activación de la procaspasa 8, como la permeabilización de la membrana lisosomal en forma independiente de receptores de muerte que produce la liberación de proteasas específicas de esta organela, como Catepsina D, al citosol. Allí, estas proteasas pueden clivar procaspasa 8 para generar caspasa 8 activa.

Por su parte, la vía intrínseca puede ser desencadenada por diferentes tipos de injurias, tales como daño en el ADN, estrés del retículo endoplásmico (RE), generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), privación de nutrientes u otras. Durante este proceso, la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial externa (MME) posibilita la liberación al citosol de factores o proteínas apoptogénicas, como el citocromo c, Smac (o Diablo) y Omi (o HtrA2).

La permeabilización de la membrana mitocondrial se encuentra mediada por proteínas de la familia Bcl-2, que incluye a Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-X_L, Bid, Bim, Bad y Noxa. Como se muestra en la Figura 1.4, los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de una o más regiones de homología Bcl-2 (BH). Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X_L) y los efectores pro-apoptóticos (Bax y Bak) comparten cuatro regiones BH y una estructura globular similar. Las proteínas con un único dominio BH (Bid, Bim, Bad, Noxa) poseen sólo una región BH denominada BH3 y son denominadas depresoras de Bcl-2 y Bcl-X_L o activadoras directas de Bax y Bak. En el caso de Bid, la forma pro-apoptótica de la proteína es un fragmento de la misma denominado Bid truncado (tBid). Como se muestra en la Figura 1.4, los efectores pro-apoptóticos se localizan en la célula en forma inactiva, ya sea solubles en el citosol (Bax) o unidos a la MME (Bak). Luego de su activación, Bax y Bak se oligomerizan y generan poros mitocondriales. Este proceso se ve promovido por la unión transiente a Bax y Bak de los activadores directos (Bid, Bim). Las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 inhiben la permeabilización de la membrana mitocondrial al secuestrar los activadores directos y/o los efectores. Otro grupo de proteínas con un único dominio BH3 se denomina “depresor” (Bad, Noxa) y promueve la acción de Bax y Bak al desplazar a las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas.

La generación de Bid truncado a partir de Bid se debe típicamente a la acción de caspasa 8, por lo que este es un punto neurálgico en el que ambas vías se interconectan. Además, existen reportes en los que se ha demostrado que el clivaje de Bid puede ser realizado por Catepsina D (Appelqvist H. y col., 2012). Finalmente, la liberación de componentes intramitocondriales al citosol produce dos efectos. En primer lugar, altera los gradientes iónicos que involucran a la membrana mitocondrial, produciendo la despolarización de estas membranas. Por otro lado, se favorece la formación de un

complejo proteico en el citosol, denominado apoptosoma, a través de la unión del citocromo c a la proteína Apaf-1 (del inglés *Apoptosis protease-activating factor-1*). El apoptosoma promueve luego el reclutamiento de procaspasa 9 para dar lugar a la caspasa iniciadora 9 activa.

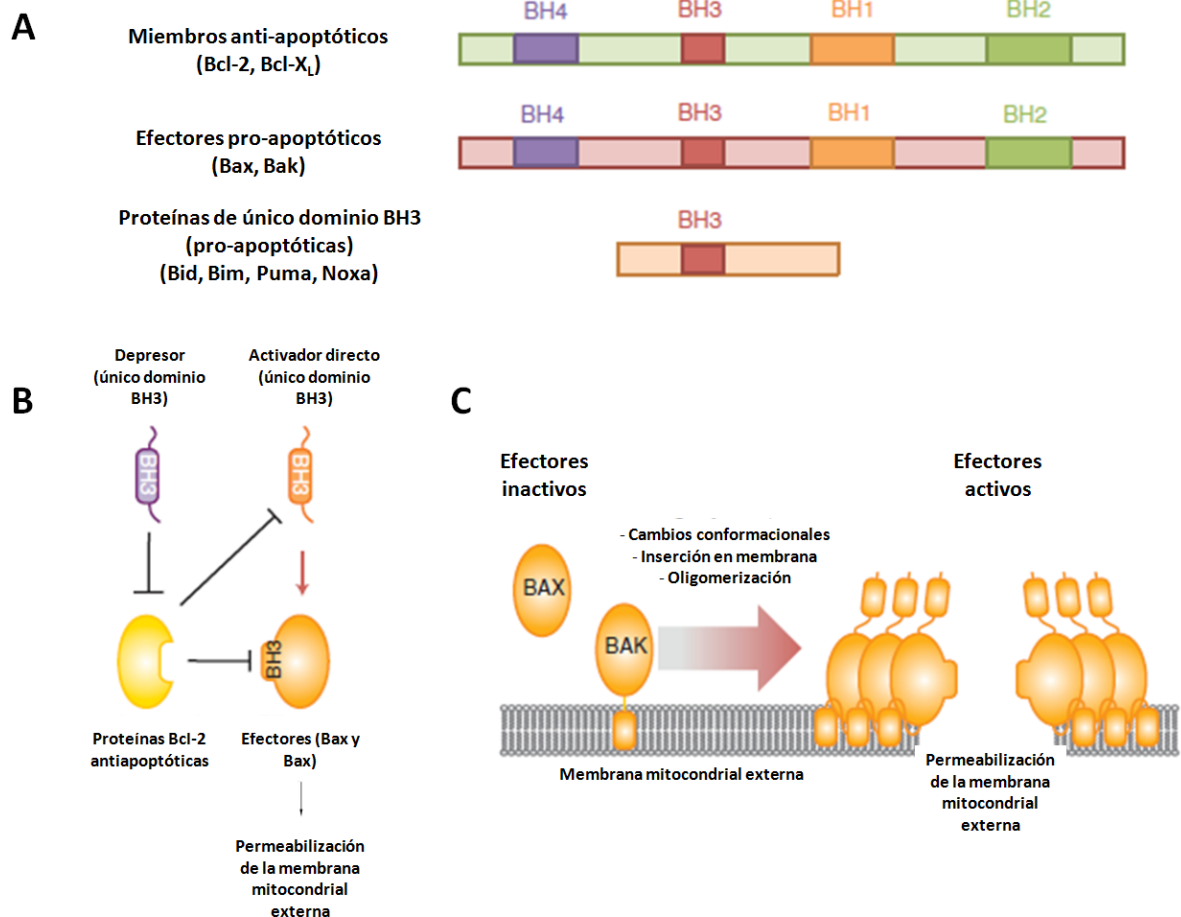


Figura 1.4. Regulación de la integridad de la membrana mitocondrial externa por proteínas de la familia Bcl-2. (A) Estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 en base a las regiones de homología Bcl-2 (BH). (B) Regulación de la actividad de Bax y Bak. (C) Proceso de formación del poro mitocondrial. Figura adaptada de Green D.R. y Llambi F., 2015.

El daño que desencadena la activación de la vía intrínseca puede no producirse directamente en la mitocondria sino “cascada arriba” en el RE, para luego afectar la mitocondria. El RE es un componente celular con un rol importante en la síntesis, el plegamiento y el tráfico de proteínas, y funciona además como un depósito o reservorio de calcio dentro de la célula (Almanza A. y col., 2018; Oakes S.A. y Papa F.R., 2015). El estrés de RE genera una acumulación de proteínas mal plegadas en la luz de esta organela y la liberación de calcio al citosol. Además, puede provocar la disociación de la proteína GRP78/BIP de otras proteínas como IRE1 y PERK, sensores de estrés del RE y

responsables de favorecer la apoptosis (Luo K. y Cao S.S., 2015; Moserova I. y Kralova J., 2012). Estas moléculas, ahora libres, se encuentran habilitadas entonces para cumplir otras funciones. IRE1 favorece la generación del poro mitocondrial al unirse a Bak y Bax, al mismo tiempo que promueve la degradación de ARNm codificante para proteínas de supervivencia, en un proceso denominado RIDD (del inglés *regulated IRE1-dependent decay of mRNA*) (Hetz C., 2012; Cao S.S. y Kaufman R.J., 2012). PERK, por su parte, inicia la activación de una compleja cascada de efectores entre los que se encuentran eIF2 α , ATF4, CHOP y ERO1 α . En conjunto, se promueve la generación de ROS, la liberación de calcio del RE, la inhibición de Bcl-2, la transcripción de Bim y la activación de DR5 independiente de ligando (Lu M. y col., 2014; Tabas I. y Ron D., 2011). Este último evento conecta el estrés del RE con la vía extrínseca.

El RE es uno de los principales reservorios de calcio dentro de la célula. La liberación de este catión al citosol puede aumentar la actividad de proteínas que requieren calcio como cofactor. Así, por un lado, podría promoverse la activación de la fosfolipasa A2 dependiente de calcio (cPLA2), con el consecuente incremento en los niveles de ácido araquidónico, una molécula involucrada en la formación del poro mitocondrial (Gugliucci A. y col., 2002; Hendrickx N. y col., 2005). Por otro lado, puede aumentar la actividad de las calpaínas, un grupo de cisteín-proteasas que poseen funciones biológicas similares a las de ciertas caspasas, y también tienen la capacidad de clivar proteínas de la familia Bcl-2 (Buytaert E. y col., 2007; Almeida R.D. y col., 2004; Oleinick N.L. y col., 2002). A su vez, las calpaínas pueden activar procaspasa 12, una caspasa murina homóloga de la caspasa 4 humana. Una vez activada, esta proteasa puede participar en la activación de procaspasa 9 a caspasa 9 en forma independiente de la vía mitocondrial (Morishima N. y col., 2002; Rao R.V. y col., 2002; Liu D. y col., 2013).

Como se esquematiza en la Figura 1.5, tanto la vía extrínseca como la intrínseca culminan produciendo el clivaje de procaspasa 3, con la consecuente generación de la caspasa efectora 3. La proforma se encuentra en forma de dímero, y tras su clivaje se generan una subunidad grande y otra pequeña. Mediante cambios conformacionales, estas subunidades forman un nuevo dímero con dos sitios activos (Green D.R. y Llambi F., 2015). Esta nueva proteasa puede clivar al menos 1.000 proteínas, como PARP-1, produciendo pérdidas o ganancias de función que conducen finalmente a las alteraciones morfológicas típicas de apoptosis.

En aquellos casos en los que la apoptosis no puede llevarse adelante (por ejemplo, por bajas cantidades de ATP), los mecanismos de autofagia y necrosis pueden potenciarse.

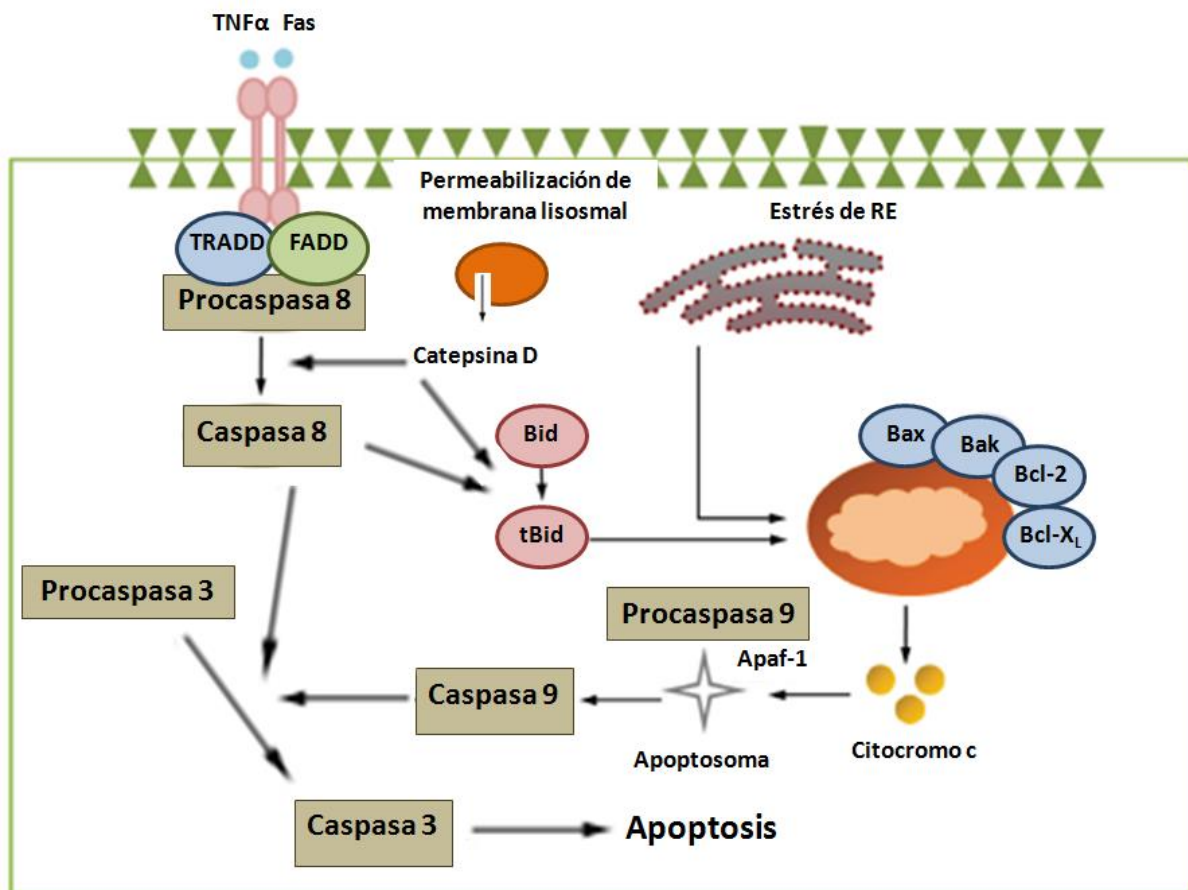


Figura 1.5. Vías apoptóticas extrínseca e intrínseca y sus interrelaciones. Figura adaptada de Zhao C. y col., 2018.

1.1.4.2. Autofagia.

La autofagia es un proceso muy estudiado que puede presentarse como un mecanismo de muerte o como una estrategia celular para la supervivencia frente a una injuria. Incluso en el ámbito de la TFD se ha descrito esta función dual (Kessel D. y Oleinik N., 2018; Buytaert E. y col. 2007), identificando a la autofagia como una vía que se activa en la célula para sobrevivir al fotodaño o bien un mecanismo de muerte si la injuria es muy grave y, sobre todo, si las células en cuestión no son capaces de desencadenar un proceso apoptótico.

A lo largo de los años se han definido varios subtipos de autofagia, que se diferencian entre sí por el tipo de mediadores moleculares involucrados y el tipo de moléculas degradadas. Los principales tipos de autofagia se esquematizan en la Figura 1.6 e incluyen la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (Galluzzi L. y col., 2017; Jacob J.A. y col., 2017). Lo que engloba a la totalidad de los mecanismos bajo el rótulo de autofagia son dos características. La primera es que involucran material citosólico. La segunda, que culminan en los lisosomas y dependen estrictamente de ellos (Galluzzi L. y col., 2017). La mayor parte de los tipos de autofagia se desarrollan en condiciones

fisiológicas y tienden a mantener la homeostasis celular mediante el reciclado de componentes intracelulares, tales como proteínas mal plegadas, agregados proteicos, organelas dañadas, etc. (Ndoye A. y Weeraratna A.T., 2016; Dokladny K. y col., 2015).

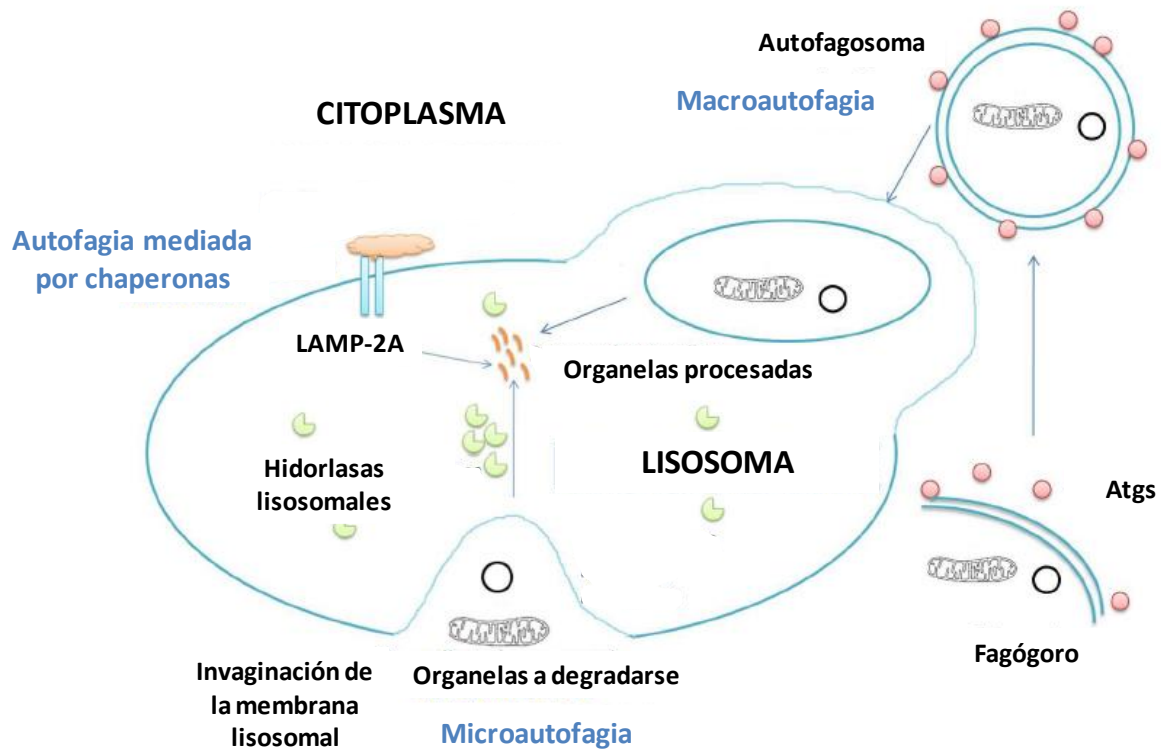


Figura 1.6. Tres tipos principales de autofagia. Esquema comparativos de los mecanismos de macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Figura adaptada de Jacob J.A., 2017.

La macroautofagia es la forma mejor caracterizada e implica cambios notables en la morfología de las organelas celulares. El detalle del proceso, así como los principales efectores moleculares involucrados, se presentan en la Figura 1.7. La iniciación del mecanismo autofágico es mediada por el complejo ULK1 (conformado por las proteínas RB1CC1-ATG13-ATG101-ULK1, no indicadas en la figura) en respuesta a diversas señales celulares. La formación del fagóforo, estructura que dará lugar al autofagosoma, requiere además del complejo PI3K, que se compone por las proteínas ATG14L, Beclina-1, VPS34 y VPS15. Por su parte el complejo proteico ATG5-ATG12-ATG16 y LC3II (proteína asociada a microtúbulo 1A/1B cadena liviana 3B) promueven la elongación del fagóforo y son requeridos para la formación del autofagosoma, estructura cerrada con capacidad de fusionarse a lisosomas. La proteína p62, unida a proteínas ubiquitinizadas marcadas para ser degradadas, se une a LC3II durante la formación de los autofagosomas mientras material celular es incorporado dentro de estas organelas nacientes. A continuación, el

autofagosoma se une al lisosoma que aporta enzimas hidrolíticas que degradarán el contenido del autofagolisosoma formado.

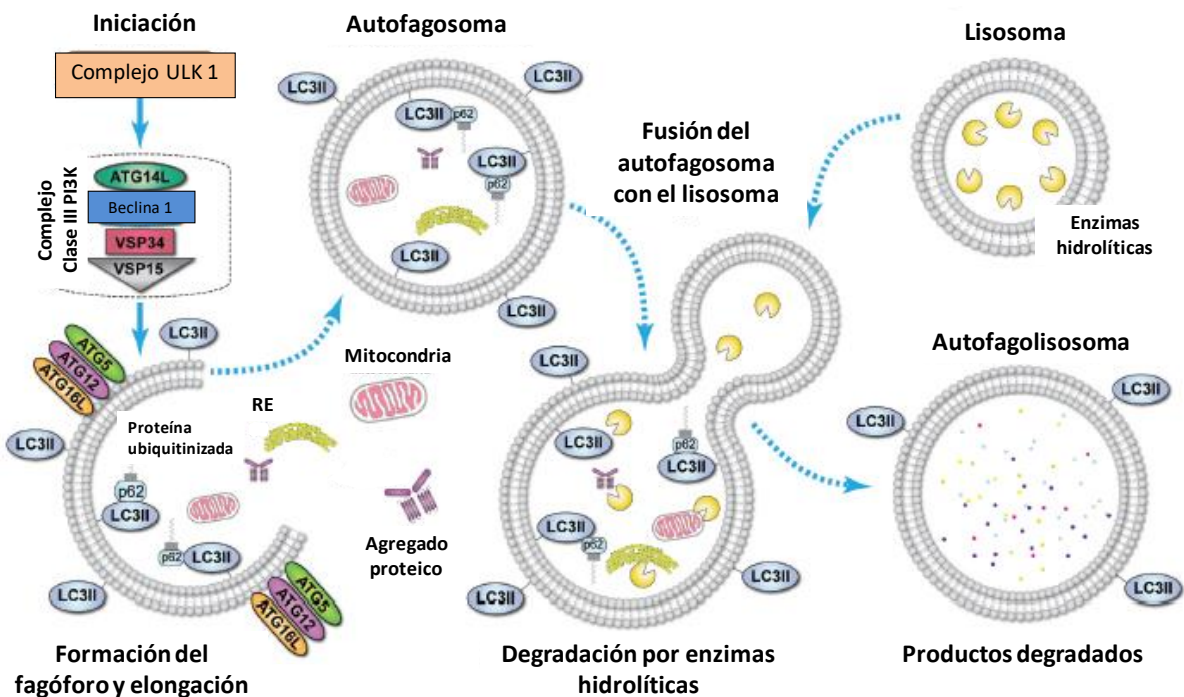


Figura 1.7. Representación esquemática del proceso macroautofágico. Los componentes a ser degradados son incorporados en vacuolas llamadas autofagosomas. Estos luego se fusionan a lisosomas para dar lugar a autofagolisosomas, estructura en la que se produce la degradación del material contenido. Figura adaptada de Ndoye A. y Weeraratna A.T., 2016.

La microautofagia (también conocida como autofagia endosomal) se presenta principalmente en plantas y levaduras. Mediante invaginaciones de la membrana lisosomal, el material citoplasmático se incorpora directamente en vacuolas.

En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas citosólicas dañadas que serán degradadas se dirigen al lisosoma en forma independiente de vacuolas. Una vez que lleguen a estas organelas, serán reconocidas específicamente por chaperonas a partir de una secuencia señal específica. Resulta importante mencionar que no se degradan organelas a través de este mecanismo. La translocación de las proteínas a degradarse desde el citosol al lisosoma depende de una forma de *splicing* específica de una proteína integral de la membrana lisosomal (LAMP-2), LAMP-2A (Cuervo A.M. y Dice J.F., 1996). Al unirse las proteínas a monómeros de LAMP-2A ubicados en la cara citosólica del lisosoma, se promueve la formación de un complejo oligomérico de translocación que posibilita el ingreso de las proteínas al lisosoma (Bandyopadhyay U. y col., 2008).

1.1.4.3. Necrosis.

La necrosis es una vía de muerte usualmente desencadenada por una injuria de origen externo y, a diferencia de la apoptosis, no produce condensación de la cromatina. Como ejemplos de algunas condiciones que provocan necrosis podemos mencionar las altas temperaturas, ciclos de congelado y descongelado y estrés mecánico. Uno de los primeros eventos que se desencadena es la rápida ruptura de mitocondrias y membrana celular, lo que produce que se libere en forma de lisis celular contenido citoplasmático al espacio extracelular. En consecuencia, existe una respuesta inflamatoria asociada a la necrosis.

1.1.4.4. Otros mecanismos.

Como se mencionara en la sección 1.1.4, procesos novedosos de muerte han sido descritos recientemente. Se comentarán sólo algunos de ellos a modo de ejemplo.

Entre los tipos de muerte celular emergentes y menos estudiados se ubica la paraptosis, cuyo nombre puede llevar a interpretaciones erróneas considerando que no se presentan mecanismos apoptóticos como activación de caspasas, condensación de la cromatina ni fragmentación celular. La característica fundamental de este proceso es la vacuolización que involucra el RE y quizás a la mitocondria (Kessel D. y Oleinik N., 2018). En el campo de la TFD, hasta ahora muy pocos fotosensibilizadores (FSs) han demostrado producir paraptosis.

La necroptosis morfológicamente se asemeja a la necrosis, pero difiere de ésta en que es un proceso activamente regulado y requiere de la quinasa RIPK3 (Green D.R. y col., 2011). Varios estímulos que desencadenan apoptosis, como Fas y TNF, pueden derivar en necroptosis si existe inhibición de caspasas.

Por su parte, la piroptosis presenta diferencias marcadas con respecto a la apoptosis tanto a nivel bioquímico como morfológico (Tait S.W.G. y col., 2014). A diferencia de la apoptosis, depende de la activación de caspasa 1 o caspasa 11 (caspasa 5 en humanos) e implica un proceso inflamatorio, caracterizado por el procesamiento de IL-1 β e IL-18 inactivas, sin clivaje de PARP-1 ni permeabilización de la membrana mitocondrial.

La ferroptosis es una forma de muerte celular regulada que depende del Fe⁺² intracelular y que a nivel endógeno se ve inhibida por una peroxidasa denominada GPX4. Puede también ser inhibida por quelantes del hierro y antioxidantes lipofílicos. A nivel morfológico se observan mitocondrias más pequeñas con mayor densidad de sus membranas, mientras que a nivel molecular se generan ROS que llevan a la peroxidación de lípidos en las membranas biológicas (Yu H. y col., 2017, Galluzzi L. y col., 2018).

1.1.5. Modelos experimentales para ensayos preclínicos en oncología.

Existen en la actualidad diversos tipos de modelos experimentales para realizar ensayos preclínicos de terapias antitumorales. Algunos ejemplos incluyen los ensayos “en tubo” (es decir, en solución, en ausencia de células) sobre proteínas aisladas; en líneas celulares en forma bidimensional aislada o combinada (co-cultivos); en cultivos 3D (de único tipo celular o co-cultivos); en cultivos derivados de células stem embrionarias o células madres pluripotentes inducidas; en organoides; en novedosos sistemas *organ on a chip*; en modelos animales y a partir de explantos obtenidos de pacientes. A mayor complejidad de la técnica empleada se reproducen mejor las características de la patología en humanos, mientras que, concomitantemente, disminuye la reproducibilidad de los ensayos. La Figura 1.8 presenta ordenados, según estas variables, los modelos disponibles para experimentación.

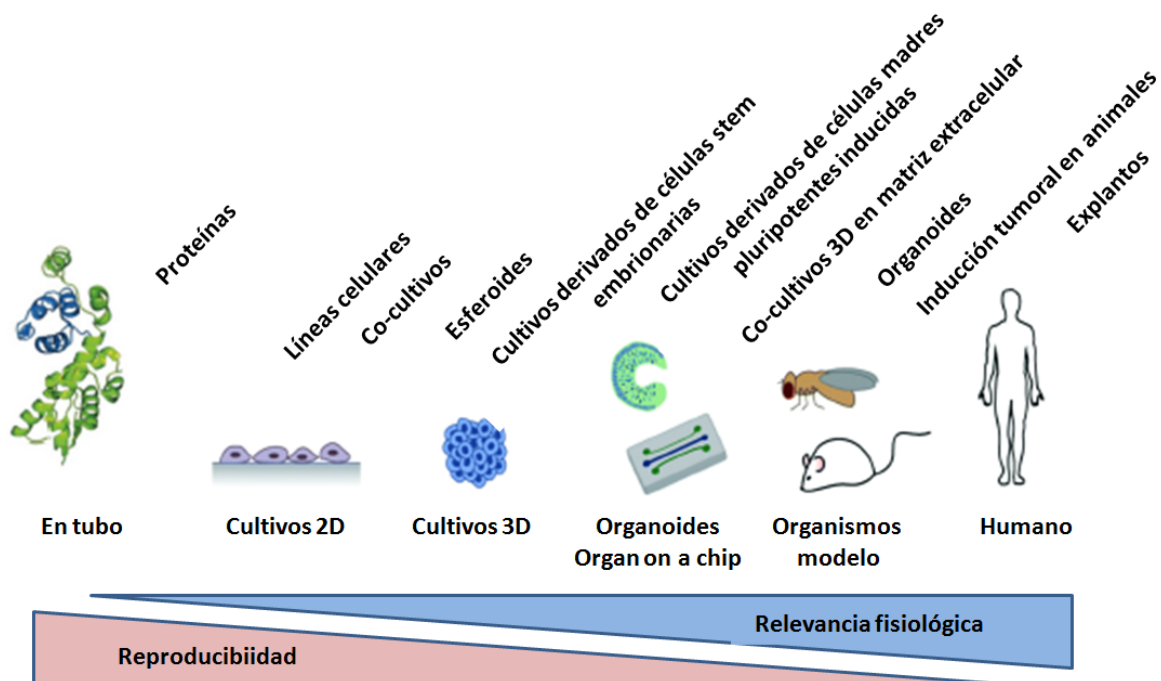


Figura 1.8. Modelos experimentales para ensayos preclínicos en oncología. Ordenamiento de modelos experimentales en función de relevancia fisiológica creciente y reproducibilidad decreciente. Figura adaptada de Jackson E.L. y Lu H., 2016.

Las líneas celulares son la herramienta más ampliamente utilizada para la evaluación de drogas oncológicas (Patel N.R. y col., 2015). Estas líneas se dividen entre aquellas que pueden mantenerse en suspensión (típicamente las obtenidas a partir de tumores hematológicos), y aquellas que crecen adheridas a una superficie. A partir de las líneas celulares, adherentes o en suspensión, es posible realizar ensayos de citotoxicidad con distintos enfoques: cultivos bidimensionales, cultivos tridimensionales o ensayos *in vivo* al inyectar estas células en animales de experimentación.

1.1.5.1. Cultivos bidimensionales.

Los cultivos bidimensionales representan el modelo más simple que utiliza líneas celulares. Si bien existen células que crecen en suspensión o sin necesidad de adherirse a algún material, la bidimensionalidad se refiere a la situación en la cual las células adherentes forman una monocapa al unirse a alguna superficie. En consecuencia, las células se “estiran” sobre el material, achatándose y por ende disminuyendo su tridimensionalidad. La facilidad en su manejo contrasta con la complejidad propia de un tumor maligno. Además, otras ventajas que presentan estos sistemas es que las líneas celulares pueden ser cultivadas durante extensos períodos de tiempo, se dividen rápidamente y son útiles para la evaluación de múltiples variables al mismo tiempo (*high throughput screening*). Si bien ciertas condiciones del microambiente tumoral, como la hipoxia y la privación de nutrientes, pueden ser inducidas artificialmente, las características inherentes a un tumor no se alcanzan completamente (Nagelkerke A. y col., 2013).

Las líneas celulares también pueden ser genéticamente modificadas con diversos propósitos. Así, dentro del amplio rango de opciones, se puede eliminar la expresión de un determinado gen para generar células *knock-down*, integrar un gen particular al material genético, mutar un gen endógeno, generar una línea reportera o bien modificar la expresión génica normal.

1.1.5.2. Cultivos tridimensionales.

La necesidad de desarrollar modelos celulares más complejos que los cultivos bidimensionales favoreció el avance de los cultivos tridimensionales en la década del 70 (Sutherland R.M. y col., 1970; Sutherland R.M. y col., 1971). Estos cultivos mantienen muchas de las características presentes en un modelo tumoral *in vivo*, como por ejemplo la capacidad de difusión molecular (como el caso del oxígeno) de 150 a 200 μm (Liu J. y col., 2017), la coexistencia de zonas superficiales en proliferación y zonas necróticas e hipóxicas en el núcleo, una intrincada red de interacciones células-célula y una matriz extracelular compleja (Froehlich K. y col., 2016). Además, estos modelos se caracterizan por la existencia de gradientes de pH, oxígeno y metabolitos. Inclusive, se ha descrito que estos cultivos pueden adquirir quimiorresistencia similar a la presentada por tumores sólidos (Al-Hajj M. y col., 2004; Desoize B. y Jardillier J., 2000). En su conjunto, estas características han posibilitado que los cultivos 3D presenten mejores capacidades predictivas que los 2D, particularmente en relación a la eficacia *in vivo* de tratamientos oncológicos (Charoen K.M. y col., 2014). La mayor dificultad que implica para una estrategia terapéutica producir la muerte celular de los esferoides, debido a las características previamente mencionadas, ha hecho posible descartar, en esta instancia, algunos fármacos como posibles candidatos y

reducir así el número de animales empleados en ensayos preclínicos (Friedrich J. y col., 2009). A pesar de las ventajas que presentan los cultivos 3D, ciertas características de los modelos *in vivo* no pueden aún reproducirse, como la posibilidad de que el agente quimioterápico no alcance el tumor debido a procesos de degradación en el torrente sanguíneo o el rol del sistema inmune durante la terapia. Debido a esto, si bien representan una herramienta de suma utilidad, aún resulta necesario ensayar fármacos en modelos animales.

Como se muestra en la Tabla 1.2, diversas técnicas han sido utilizadas para obtener esferoides (Patel N.R. y col., 2015). Una de ellas es el método “de la gota colgante”, el cual consiste en depositar sobre la cara interna de la tapa de algún material de cultivo de elección 1.000 a 30.000 células en una gota de medio completo (20 a 30 μ l). Una vez que la tapa se ubica sobre la placa correspondiente, las células presentes en la gota colgante tienden a agruparse debido al efecto de la fuerza de gravedad. Por otro lado, el método “por mezclado” implica colocar una suspensión celular en un gran recipiente, como un erlenmeyer. Dentro del mismo, se produce una agitación constante mediante un mezclador

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de métodos de obtención de esferoides.

Protocolo	Ventajas	Desventajas
Gota colgante	Bajo costo, simple, permite obtener co-cultivos, aplicable a muchas líneas celulares	Requiere mucha manipulación, tiempo, falta de nutrientes para crecimiento prolongado
Por mezclado	Bajo costo, simple, permite producción en masa	Difícil de obtener co-cultivos, requiere equipamiento específico. Tiempo
Estructuras prefabricadas	Útil para células con baja tendencia a formar esferoides	Costoso, difícil de escalar, materiales utilizados pueden alterar células.
Sustrato no adherente	Simple, reproducible, escalable, aplicable a muchas líneas celulares.	Requiere mucha manipulación de las células

Adaptada de Patel N.R. y col., 2015.

que provoca que luego de 4 a 6 semanas se formen los agregados celulares. Existe también un método basado en el uso de estructuras prefabricadas de alginato, gelatina, galactósido u otros (Glicklis R. y col., 2000; Teratani T. y col., 2005). Finalmente, el método del sustrato no adherente (*liquid overlay*) consiste en agregar las suspensiones celulares sobre un material al que no puedan adherirse, y que posea una geometría que favorezca los contactos entre las células. Si el material sobre el que se depositan las células no presenta por sí mismo características que eviten la adhesión celular, este puede ser pretratado de forma tal de generar una fina capa que se interponga entre el material y las células. Para ello, se suele recurrir a soluciones de ágar o poli(2-hidroxietil metacrilato).

1.1.5.3. Modelos *in vivo*.

Los modelos animales, aunque son relativamente costosos, implican tiempos de experimentación prolongados y requieren de un gran número de animales por grupo debido a su alta variabilidad, son los que más asemejan su microambiente tumoral al de un paciente. Asimismo, debido a sus características anatomofisiológicas, resultan modelos de elección para ensayos toxicológicos. Los ratones son la especie animal más utilizada para los ensayos en oncología, existiendo hoy en día más de 400 cepas de ratones empleadas regularmente. En el caso de la TFD, las cepas más usadas son Balb/c, C57BL/6, C3H y DBA2. Los modelos animales, además, se pueden caracterizar por sus modificaciones genéticas y el grado de inmunosupresión (Cekanova M. y Rathore K., 2014). Así, por ejemplo, resulta importante resaltar que, según la terapia evaluada, se preferirá un animal inmunosuprimido en el caso de utilizarse células de origen humano o uno inmunocompetente si se espera que el tratamiento active una respuesta inmune antitumoral. En particular, en ensayos de terapia fotodinámica en los cuales se ha descrito que existe un componente inmunológico que contribuye a la erradicación del tumor, es preferible seleccionar animales inmunocompetentes (Jalili A. y col., 2004).

Otro modo de clasificar los modelos animales se basa en la concordancia entre el sitio de desarrollo tumoral en el modelo y el sitio del cáncer en la patología estudiada. En los modelos subcutáneos o ectópicos estos sitios difieren, ya que una línea de células tumorales es inyectada típicamente en el flanco del ratón independientemente del tejido que dio origen a la línea celular. Por el contrario, en los modelos ortotópicos los tumores se desarrollan en el mismo tejido del que proviene la línea celular. Este procedimiento suele requerir de cirugía y es particularmente útil para el estudio del proceso de metástasis, ya que la forma en la que se da el mismo depende del sitio de inyección (Talmadge J.E. y col., 2007; Day C. y col., 2015).

También los modelos animales se pueden clasificar según cuál sea la especie animal utilizada y la especie de la que proviene el material tumoral. En este sentido, los tumores

humanos implantados en animales inmunosuprimidos corresponden a modelos xenográficos (McIntyre R.E. y col., 2015). Estos ratones pueden carecer de timo debido a

Tabla 1.3. Modelos tumorales singénicos subcutáneos.

Línea celular	Tipo de tumor	Cepa murina	Referencia
EMT6	Sarcoma de mama	Balb/c	Korbelik M. y col., 1996
CT26	Carcinoma de colon	Balb/c	Belicha-Villanueva A. y col., 2012
DA3 ^{HI}	Adenocarcinoma de mama	Balb/c	Blank M. y col., 2000
MS-2	Fibrosarcoma	Balb/c	Canti G. y col., 1994
4T1	Mama	Balb/c	Tong Z.S. y col., 2012
B16	Melanoma	C57BL/6	Skidan I. y col., 2008
LLC	Adenocarcinoma de pulmón de Lewis	C57BL/6	Merchant S. y col., 2010
TC1	Linfoma	C57BL/6	Kim Y.W. y col., 2012
FsaR	Fibrosarcoma	C3H/HeN	Korbelik M. y col., 2003
DLM-8	Osteosarcoma	C3H	Satonaka H. y col., 2010
NXS2	Neuroblastoma	A/J	Gil M. y col., 2011

Adaptado de Silva Z.S. y col., 2015.

una mutación en el gen *FOXN1*, o bien ser deficientes o carentes de células T y B (Silva Z.S. y col., 2015). A su vez, dentro de los modelos xenográficos, es posible utilizar dos protocolos experimentales (Sebolt-Leopold J.S., 2018). En uno de ellos, se inyecta una línea celular humana en los animales inmunodeficientes. En el segundo, se inyecta una porción del tumor extraído de un paciente mediante biopsia. De este modo, se puede evaluar un tipo

de medicina más personalizada en función de las características particulares de cada tumor primario.

El modelo singénico, por el contrario, consiste en la implantación de las células tumorales en la misma especie de la que proviene la línea celular. Estos modelos son de elección en aquellos casos en los que se desea evaluar la posible participación del sistema inmune en respuesta al tratamiento. En la Tabla 1.3 se detallan algunos modelos singénicos empleados en investigación.

Otra estrategia para la formación de tumores consiste en la generación de tumores “autóctonos” mediante la exposición a agentes carcinogénicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos), radiaciones o virus. La aparición espontánea de tumores, por el contrario, sólo ocurre naturalmente en el 1% de los animales (Evans J.P. y col., 2016). Estos modelos reproducen en forma más exacta las etapas de la carcinogénesis (Ruggeri B.A. y col., 2014). Otro modelo utilizado en las investigaciones oncológicas es el de los animales genéticamente modificados, que representan con mayor fidelidad el proceso carcinogénico en humanos (Lee H., 2014). Desde la década de 1980 se han desarrollado modelos transgénicos, *knock-out* y *knock-in* (Frese K.K. y Tuveson D.A., 2007) para estudiar tumores de pulmón, colon, estómago, esófago, páncreas, hígado, mama, ovario, próstata, vejiga, riñón, cerebro y piel (Frese K.K. y Tuveson D.A., 2007).

Un último ítem que resulta relevante destacar con respecto a los modelos animales es la elección del sexo de los mismos. Numerosas investigaciones destacan la importancia de la elección del sexo de los animales, sobre todo teniendo en cuenta que resultados disímiles pueden ser obtenidos para machos y hembras (Curry B., 2001; Zheng S. y col., 2007). Ha sido postulado que estas diferencias podrían ser consecuencia de los distintos perfiles hormonales, conductuales y metabólicos.

1.1.6. Carcinoma colorrectal.

1.1.6.1. Definiciones y características.

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad heterogénea que se presenta en el colon y en el recto, ambas porciones del intestino grueso. El colon tiene cuatro secciones: ascendente, transversa, descendente y sigmoidea, siendo este último donde se presenta el mayor número de casos (Aran V. y col., 2016). La anatomía del intestino grueso se representa en la Figura 1.9. Desde un punto de vista clínico, los cánceres de colon se subdividen en proximales, si se originan en la porción ascendente o transversa, y en distales, si se presentan en la sección descendente o sigmoidea. Se denomina cáncer rectal a aquellos que aparecen a 15 cm o menos del esfínter anal.

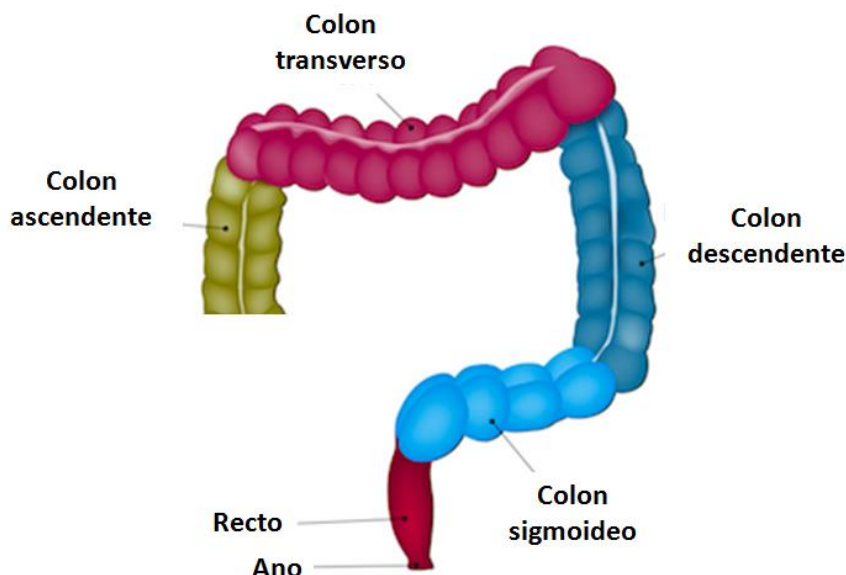


Figura 1.9. Secciones del intestino grueso.

A grandes rasgos, se identifican dos subtipos de CCR. Uno de ellos es de tipo hereditario con un claro patrón de transmisión intrafamiliar, mientras que el otro se asocia a ciertas variantes genéticas que favorecen la aparición de la enfermedad.

La alta tasa de replicación del epitelio intestinal lo convierte en un tejido proclive a transformaciones malignas. La mayoría de los CCR se desarrollan lentamente a partir de adenomas o pólipos adenomatosos que se originan en el revestimiento interno del colon o del recto (Levine J.S. y Ahnen D.J., 2006; Testa U. y col., 2018). Si bien estos pólipos son benignos, algunos de ellos pueden transformarse en malignos. En este contexto, se ha sugerido que cuatro a cinco mutaciones son necesarias para el desarrollo de tumores malignos, siendo crítica para la carcinogénesis la acumulación de mutaciones más que el orden específico en el que se producen (Basu A.K., 2018). Desde un punto de vista genético, el CCR no es una única enfermedad sino un conjunto heterogéneo. Las mutaciones más usuales implican una exacerbada activación de genes como *APC*, *PI3KCA*, *SMAD4*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS* y *BRAF*. Las alteraciones en *KRAS*, *NRAS* y *BRAF* ocurren independientemente, en forma no acumulativa, y dan cuenta del 55 al 60% de todos los CCR (Testa U. y col., 2018). Estas mutaciones tienen como efecto la desregulación de importantes vías de transducción de señales asociadas a la proliferación y apoptosis, como son las vías WNT, TGF- β , EGFR, MAPK y PI3K.

Distintos marcadores moleculares se encuentran asociados al desarrollo y la capacidad metastásica del CCR. Por ejemplo, ha sido demostrado que el potencial metastásico se relaciona con los niveles de expresión de moléculas de adhesión celular, tales como cadherinas y cateninas. Cuando los niveles de estas proteínas se encuentran disminuidos

se facilita la liberación de células tumorales del tumor primario, por lo que estas moléculas, además de mediar la metástasis, adquieren también un valor pronóstico (Paschos K.A. y col., 2009). Otros factores que predicen un peor pronóstico son la obstrucción y/o perforación del intestino, los niveles elevados en suero del antígeno carcinoembrionario, una histología tumoral poco diferenciada y un mayor número de nódulos linfáticos colonizados por las células tumorales.

Como en otros tumores sólidos, las metástasis son la principal causa de muerte asociada al cáncer. Al momento del diagnóstico, el 25% de los pacientes ya presentan metástasis, mientras que el 50% la desarrollará en algún momento de la enfermedad. El hígado es el órgano más frecuentemente colonizado por el CCR debido al drenaje venoso, representando el 50% de los casos. En segundo lugar se ubican los pulmones con el 10 a 15%, mientras que la metástasis en el peritoneo se presenta en el 4 a 13% de los casos (Testa U. y col., 2018). Los tumores rectales son más proclives a generar metástasis pulmonar, mientras que el cáncer de colon presenta mayor tropismo por el hígado y suele asociarse a un mejor pronóstico.

La clasificación según el sistema TNM mostrada previamente (sección 1.1.3) ha reemplazado en CCR a la estratificación sugerida por Cuthbert Duke a principios del siglo XX. Este sistema antiguo dividía las patologías en cuatro etapas. La etapa A se caracterizaba por un crecimiento localizado del tumor, invadiendo levemente la capa muscular del colon. En la etapa B, el cáncer había ya atravesado la capa muscular. La etapa C implicaba que el tumor había alcanzado algún nódulo linfático vecino al intestino, y finalmente la etapa D se traducía en metástasis distante a hígado o pulmón. La baja potencia de este sistema para predecir el pronóstico de pacientes en etapas B y C llevó a su reemplazo por nuevos métodos de estratificación. El sistema de estratificación TNM ha sido recientemente actualizado para CCR. En la Tabla 1.4 se resume la nueva clasificación presentada en la 8va. edición del manual *Cancer Staging* producido por el Comité Americano Conjunto del Cáncer.

En los últimos años, diversos grupos han generado nuevos sistemas de clasificación para el CCR (Wang W. y col., 2018). Estas estratificaciones se basan en otra serie de parámetros mayoritariamente relacionados con los perfiles genéticos, epigenéticos, inflamatorios, inmunológicos y transcripcionales de cada paciente. Así, se avanza en la posibilidad de describir cada vez con mayor detalle cada tipo de tumor, orientando el tratamiento hacia una medicina personalizada.

Tabla 1.4. Clasificación del CCR según sistema TNM.

Estadío	Tumor	Nódulo linfático	Metástasis	Comentarios
0	Tis	N0	M0	El tumor se encuentra en su etapa más temprana. Carcinoma <i>in situ</i> (Tis). No atravesó aún la mucosa del colon. No se ha extendido a nódulos linfáticos vecinos (N0) ni a sitios distantes (M0).
I	T1, T2	N0	M0	El tumor atravesó la mucosa muscular y alcanzó la submucosa (T1). Puede haber alcanzado inclusive la túnica muscular (T2).
IIA	T3	N0	M0	El tumor alcanzó la túnica serosa pero aún no la atravesó (T3). No ha colonizado tejidos cercanos.
IIB	T4a	N0	M0	El tumor atravesó la túnica serosa pero no ha colonizado tejidos cercanos (T4a).
IIC	T4b	N0	M0	El tumor atravesó la túnica serosa y ha colonizado tejidos cercanos (T4b).
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	El tumor atravesó la mucosa muscular y alcanzó la submucosa (T1). Puede haber alcanzado inclusive la túnica muscular (T2). El tumor se esparció a 1 a 3 nódulos linfáticos vecinos (N1) o a tejido graso cercano a los nódulos (N1c).
IIIA	T1	N2a	M0	El tumor se ha esparcido a 4 a 6 nódulos linfáticos cercanos (N2a).
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	El tumor alcanzó la túnica serosa pero aún no la atravesó (T3) o sí la atravesó sin colonizar tejidos cercanos (T4a). El tumor se esparció a 1 a 3 nódulos linfáticos vecinos (N1) o a tejido graso cercano a los nódulos (N1c).
IIIB	T2-T3	N2a	M0	Puede haber alcanzado la túnica muscular (T2) o la túnica serosa, sin haberla atravesado (T3). El tumor se ha esparcido a 4 a 6 nódulos linfáticos cercanos (N2a).

IIIB	T1-T2	N2b	M0	El tumor atravesó la mucosa muscular y alcanzó la submucosa (T1). Puede haber alcanzado inclusive la túnica muscular (T2). El tumor se ha esparcido a 7 o más nódulos linfáticos cercanos (N2b).
IIIC	T4a	N2a	M0	El tumor atravesó la túnica serosa pero no ha colonizado tejidos cercanos (T4a). El tumor se ha esparcido a 4 a 6 nódulos linfáticos cercanos (N2a).
IIIC	T3-T4a	N2b	M0	El tumor alcanzó la túnica serosa pero aún no la atravesó (T3) o sí la atravesó sin colonizar tejidos cercanos (T4a). El tumor se ha esparcido a 7 o más nódulos linfáticos cercanos (N2b).
IIIC	T4b	N1-N2	M0	El tumor atravesó la túnica serosa y ha colonizado tejidos cercanos (T4b). Se ha esparcido al menos a un nódulo linfático vecino o a tejido graso cercano a los nódulos.
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a	El tumor se ha esparcido a un órgano distante (como hígado o pulmón) o a un nódulo linfático distante pero no a zonas distantes del peritoneo (M1a).
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b	El tumor se ha esparcido a más de un órgano distante o a más de un nódulo linfático distante pero no a zonas distantes del peritoneo (M1b).
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c	El tumor se ha o no esparcido a un órgano distante (como hígado o pulmón) o a un nódulo linfático distante. Se encuentra tejido tumoral en zonas distantes del peritoneo (M1c).

Adaptado de la 8va. edición del manual Cancer Staging (2017) producido por la AJCC.

1.1.6.2. Epidemiología.

El CCR es la enfermedad maligna gastrointestinal más usual y representa el tercer tipo de tumor más frecuente a nivel global, afectando principalmente a países desarrollados. En 2015, el CCR representó el 9,7% de los nuevos casos de cáncer, involucrando a 814.000 hombres y 664.000 mujeres (datos de *International Agency for Research in Cancer*).

En el ranking de muertes por cáncer a nivel mundial, el CCR se ubica en cuarto lugar. En 2015, 774.000 defunciones se debieron a este tipo de tumor. Este valor representa el 8% del total de defunciones por año (Testa U. y col., 2018). En los países desarrollados, la mortalidad asociada a esta enfermedad asciende al 33% (Testa U. y col., 2018). En Europa, por ejemplo, el CCR es la segunda causa de muerte más frecuente por cáncer (Testa U. y col., 2018).

La tasa de incidencia se encuentra asociada a una serie de factores de riesgo, como factores hereditarios, obesidad, diabetes, sexo masculino y hábitos alimenticios (Haggar F.A. y col., 2009; Kolligs F.T., 2016; Favoriti P. y col., 2016; Doleman B. y col., 2016; Aran V. y col., 2016). Se ha descripto, además, que la incidencia se encuentra relacionada con la etnia, presentando los valores más altos la etnia negra, con 67,2 y 50,7 casos cada 100.000 hombres y mujeres, respectivamente. Existen estudios que afirman que esta enfermedad se encuentra en expansión. En particular, en Estados Unidos, el número de nuevos casos se espera que aumente en jóvenes adultos de entre 20 y 49 años para el año 2030 (Bailey C.E. y col., 2015; Kohler B.A. y col., 2011).

Según datos del Instituto Nacional del Cáncer de la Argentina, el CCR es el segundo cáncer más frecuente en nuestro país, representa el 11,8% del total de casos en ambos sexos, detrás del cáncer de mama (16,8%) y antes del de próstata (9,7%). Según estadísticas de 2012, en Argentina se produjeron 13.558 nuevos casos, de los cuales 7.237 fueron en hombres y 6.321 en mujeres, con una tasa de 29,9 por cada 100.000 habitantes hombres y de 19,0 por cada 100.000 habitantes mujeres.

En 2015, esta enfermedad provocó 7603 muertes en Argentina, el 12% del total de muertes por tumores malignos, ubicándose en el segundo lugar luego del cáncer de pulmón, con 9.790 muertes (14,9%) y precediendo al cáncer de mama que produjo 6.023 defunciones (9%). Si se analizan estos valores en la escala de los días, esta patología provoca en nuestro país alrededor de 20 muertes por día.

1.1.6.3. Tratamientos disponibles.

Los tratamientos usualmente utilizados para la erradicación de tumores incluyen cirugía, quimioterapia (existen más de 250 drogas disponibles en el mercado), radioterapia, inmunoterapia y hormonoterapia. Los procedimientos quirúrgicos requieren anestesia general, días o semanas de internación y, en general, no logran evitar una alta tasa de reaparición del cáncer (Mesquita M.Q. y col., 2018). En cuanto a la quimio y radioterapia, suelen tener asociados importantes efectos secundarios derivados de su baja selectividad por el tejido tumoral, entre los cuales podemos mencionar anemia, pérdida de peso, alopecia, infertilidad, constipación, edema, fatiga, náuseas, dolor, infecciones y problemas para conciliar el sueño. El desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de afecciones

oncológicas es un campo en constante expansión, iniciado a mediados de la década de 1950 (Figura 1.10).

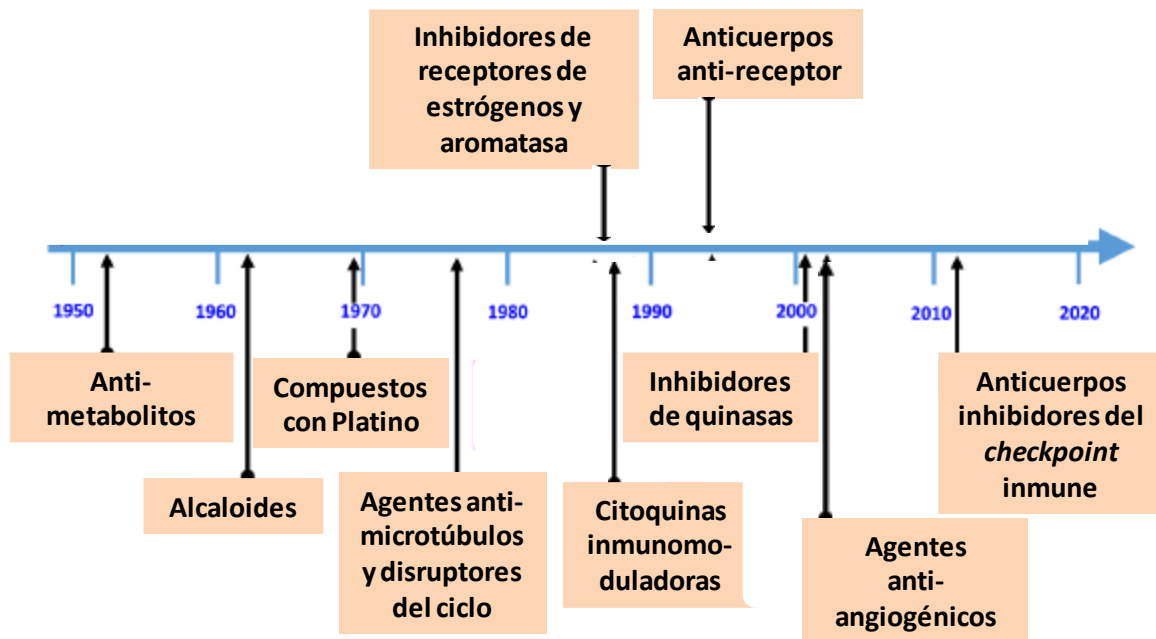


Figura 1.10. Línea de tiempo representando avances quimioterapéuticos en el tratamiento de tumores. Figura adaptada de Day C. y col., 2015.

En el caso del CCR, el tratamiento varía según la gravedad del caso. Existen muchos factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar la terapia apropiada para cada paciente, entre ellos el estado general del individuo y las características particulares del tumor. Puesto que sería muy extenso presentar la terapia para cada caso, que además depende de la fuente o sociedad médica consultada, aquí sólo se presentarán los lineamientos generales. En todos los estadios se recomienda la extirpación quirúrgica del tumor si fuera posible, acompañada o no de quimioterapia. En función de la gravedad de la patología pueden utilizarse fármacos similares con aumento de dosis o variación en el tiempo entre dosis.

Para tumores clasificados como Tis o T1, sin presencia de células tumorales en nódulos linfáticos, el tratamiento recomendado es de tipo local (endoscopia o escisión transanal). Si la evaluación histopatológica del tumor denotara características aberrantes, el paciente deberá someterse a una nueva cirugía con el objetivo de remover nódulos linfáticos (Shinagawa T. y col., 2018). En el caso de tumores que invaden más allá de la submucosa, el paciente debe someterse a cirugía para extirpar el tumor junto con todos los tejidos afectados y los ganglios linfáticos cercanos. Si bien esta es la recomendación de la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Japonesa de Cáncer de Colon y Recto, las guías de Estados Unidos (*National Comprehensive Cancer Network*) y de Europa (*European Society*

for Medical Oncology) recomiendan, para estos casos más avanzados, la extirpación de los tejidos luego de quimio y radioterapia, sin disección de los nódulos linfáticos laterales.

La quimioterapia también es utilizada en forma adyuvante para disminuir la probabilidad de recurrencias post-operatorias, y en aquellos casos graves en los que el tumor no puede ser extirpado. La quimioterapia adyuvante es generalmente recomendada para pacientes en un estadio II grave (biopsia de menos de 12 nódulos linfáticos, tumor poco diferenciado, invasión vascular o linfática, tumor que genera obstrucción) o estadio III. Las drogas más utilizadas en la terapia post-operatoria son 5-fluoruracilo (5-FU) y combinaciones de oxaliplatino (OX) y otras drogas como FLOX (leucovorina + 5-FU + OX), una variante denominada FOLFOX (leucovorina + 5-FU + OX) y CapeOX (capecitabina + oxaliplatino). El objetivo de la quimioterapia en tumores no operables es prolongar la sobrevida y retardar el crecimiento tumoral. En estos casos, los tratamientos de primera línea incluyen CapeOx, FOLFOX y FOLFIRI (leucovorina + 5-FU + irinotecan) y pueden ser combinados con terapias blanco-específicas como cetuximab y panitutumab, anticuerpos monoclonales para EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal).

En cuanto a los pacientes que presentan metástasis, los tratamientos de primera línea y menos agresivos incluyen FOLFOX, CapeOX y capecitabina (Salvatore L. y col., 2017). En casos más avanzados, e idealmente según si el tumor presenta RAS mutado o no, se deberían añadir al esquema de tratamiento anticuerpos monoclonales de alto costo (Martini G. y col., 2017). En el caso de RAS *wild-type* son de elección anticuerpos monoclonales para EGFR, como cetuximab y panitumumab. Si en cambio RAS se encuentra mutado, se prefiere asociar anticuerpos monoclonales para VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) como bevacizumab, para el receptor 2 de VEGF como ramucirumab, la proteína recombinante de fusión zivafibercept o bien regorafenib, un inhibidor de quinasas de administración oral.

Aunque la introducción de nuevos agentes terapéuticos ha mejorado la tasa de respuesta en pacientes con CCR (Patil H. y col., 2017), en el campo de la oncología todavía representa un desafío el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento menos tóxicas y que generen menor resistencia. Si bien se han realizado diversos ensayos clínicos de TFD con resultados positivos para el tratamiento del CCR (Kawczyk-Krupka A. y col., 2015), ninguno de los FSs probados por el momento, incluyendo el ácido aminolevulánico (ALA), Photofrin®, Temoporfin, derivados de hematoporfirina (HpD), LS11, m-THPB y Talaporfin (Kawczyk-Krupka A. y col., 2016), logró ser incorporado al uso clínico. No obstante, resta aún por evaluar la eficacia terapéutica de las ftalocianinas (Pcs) como FSs en pacientes con CCR.

1.1.6.4. Aproximaciones experimentales a la investigación del carcinoma colorrectal.

1.1.6.4.1. Modelos *in vitro*.

Durante décadas, las líneas celulares resultaron herramientas apropiadas para evaluar el significado funcional de aberraciones genéticas en la progresión tumoral. En el caso del CCR, estas líneas han sido útiles no sólo para el descubrimiento de nuevas drogas sino también para la identificación de biomarcadores (Sebolt-Leopold J.S., 2018). Diversos grupos de trabajo han investigado en detalle las cualidades de estas líneas celulares. Ya fuera a través del análisis de 80 líneas usualmente utilizadas en investigación (Mouradov D. y col., 2014) o de 150 líneas en un proyecto más ambicioso (Medico E. y col., 2015), se ha demostrado que estos modelos presentan importantes similitudes con los tumores primarios que se desarrollan en pacientes.

Se han dedicado múltiples esfuerzos a la caracterización de líneas celulares con la finalidad de identificar cuál puede resultar el mejor modelo para CCR en función del objetivo buscado (Ahmed D. y col., 2013). Estas evaluaciones incluyen una amplia gama de parámetros, tales como la velocidad de crecimiento, el perfil genético (principalmente oncogenes y genes supresores de tumores), la morfología, el estadio, la inestabilidad de microsatélites (MSI) y el fenotipo metilador o no de islas CpG (CIMP). Un resumen de algunas de estas características para las líneas de origen humano más ampliamente utilizadas se presenta en la Tabla 1.5.

Dentro de las líneas celulares de origen murino, una de las más utilizadas en la investigación preclínica del CCR es la línea CT26, correspondiente a un carcinoma de colon. Estas células, obtenidas a partir de la inducción de tumores en ratones Balb/c con el agente químico N-nitroso-N-metiluretano (Brattain M.G. y col., 1980), son frecuentemente empleadas para generar modelos *in vivo* singénicos. Su uso tan difundido se debe, además, a que las mutaciones presentes en genes relevantes a nivel oncológico, así como el patrón de expresión génica, son similares a las que se producen en un CCR humano espontáneo, poco diferenciado, agresivo y refractario a terapias convencionales (Castle J.C. y col., 2014).

Más allá de los clásicos modelos bidimensionales, se han comenzado a emplear, además, modelos tridimensionales como los esferoides o los organoides. Mientras que los primeros son poblaciones celulares homogéneas, los segundos presentan subpoblaciones que los hacen modelos muy interesantes para la evaluación de tratamientos personalizados

Tabla 1.5. Características genéticas y epigenéticas de una serie de líneas celulares para el estudio del CCR.

Línea celular	KRAS BRAF	PIK3CA PTEN	TP53	MSI	CIMP
DLD-1 HCT-15 TC71 HT-29 WiDr FRI NCI-H508 SW948					
CO-115 HCT-116 RKO LS-174T EB					
IS1 IS3 LS1034 SW1116 SW480 SW620					
LoVo					
CaCo-2 COLO 320 V9P					
SW48					

Gen mutado
 Positivo

MSI: inestabilidad de microsatélites; CIMP: fenotipo metilador de islas CpG. Tabla adaptada de Ahmed D. y col., 2013.

1.1.6.4.2. Modelos *in vivo*.

Las mismas estrategias mencionadas con anterioridad para la investigación del cáncer en modelos *in vivo* (sección 1.1.5.3) han sido utilizadas para el estudio del CCR. Dentro de este contexto, debe tenerse en cuenta que mientras que los modelos animales ectópicos han sido los más empleados para el *screening* de agentes citotóxicos a gran escala, debido especialmente a su alta reproducibilidad, los modelos ortotópicos resultan de elección a la hora de estudiar el proceso metastático (Evans J.P. y col., 2016).

Por otro lado, tanto los modelos xenográficos como los singénicos fueron ampliamente aprovechados en la investigación del CCR desde la década de 1960 (Evans J.P. y col., 2016). Las combinaciones más utilizadas en ratones inmunocompetentes han sido las de células CT26 en ratones Balb/c, células MCA38 en ratones C57BL/6, células CC531 en ratas Wag/Rig y células DHD/K12-TRb en ratas BDIX. Algunos artículos que han empleado células CT26 en ratones de la cepa Balb/c para la evaluación de protocolos de TFD se presentan en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Protocolos experimentales para inducción tumoral ectópica en modelos singénicos CT26-Balb/c.

Vía de administración de las células	Sitio de inyección	Número de células inyectadas	Fotosensibilizador administrado	Referencia
Subcutánea	Hombro izquierdo	300.000	2-(1-hexiloxietil)-2-devinilpiro feoforbido-a	Belicha-Villanueva A. y col., 2012
Subcutánea	Flanco derecho	5.000.000	Ácido aminolevulínico	Naghavi N. y col., 2010
Subcutánea	Flanco	5.000.000	Protoporfirina IX	Bronshteint I. y col., 2006
Subcutánea	-	200.000	Ácido aminolevulínico	Haddad R. y col., 2000
Subcutánea	-	200.000	Ftalocianina de aluminio	Kashtan H. y col., 1996
Subcutánea	Flanco izquierdo	50.000	Hipericina	Sanovic R. y col., 2011

El símbolo “-” hace referencia a que la información requerida no fue especificada por los autores.

En cuanto a los modelos autóctonos, para promover la aparición de CCR se han utilizado diversos agentes químicos como la dimetilhidrazina, el azoximetano, la N-metil-N-nitrosourea, la N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina y aminas heterocíclicas (Evans J.P. y col., 2016).

Finalmente, se han desarrollado numerosos modelos de ratones genéticamente modificados. Entre ellos, se pueden mencionar los animales para el estudio del proceso metastásico sin *APC* y con *KRAS* mutado (*KRAS*^{G12V/+}), o aquellos con el perfil genético *APC*^{Min/+} *TP53*^{-/-}. Por su parte, el ratón *APC*^{1322T/+} ha sido aprovechado debido a que reproduce una de las mutaciones más usuales en humanos. Como se comentó en la sección 1.1.6.1, la vía de señalización de TGF- β se encuentra usualmente desregulada en el CCR. Por ende, se ha desarrollado para el estudio de esta vía un modelo *knock-out* para una proteína cascada abajo de TGF- β , SMAD3. Estos animales presentan una mayor

incidencia de carcinoma de colon (Golovko D. y col., 2015; McIntyre R.E. y col., 2015; Testa U. y col., 2018).

Cabe también mencionar que comienzan a aparecer nuevos modelos animales en oncología que podrían llegar a adquirir importancia en los próximos años. Dentro de los mismos, se puede mencionar al que emplea *zebrafish*, una especie de pez que muestra grandes similitudes con los humanos en cuanto a la biología tumoral, los desórdenes causados por carcinógenos y el patrón morfológico de los tumores (Lu J.W. y col., 2017).

1.2. Terapia fotodinámica.

1.2.1. Definición y fundamento físico.

La Terapia Fotodinámica (TFD) se basa en el uso de una molécula, denominada FS, que es preferencialmente retenida por el tejido a tratar. Los otros dos componentes claves en este tipo de terapia son la luz, de una adecuada potencia y longitud de onda, y el oxígeno molecular (Kou J. y col., 2017; Gomes A.T.P.C. y col., 2018). Luego de la aplicación del FS, se deja transcurrir un cierto período de tiempo antes de realizar la irradiación lumínica. La fotoactivación con luz induce la generación de especies citotóxicas, como oxígeno singlete, que llevan a la destrucción irreversible del tejido tratado (Dougherty T.J., 1987; Konan Y.N. y col., 2002). En su aplicación clínica resulta necesario que, al momento de administrarse el FS, el paciente se encuentre en la oscuridad para así minimizar la probabilidad de que llegue luz y active el FS en otras partes del organismo. Luego de la irradiación sobre el tejido dañado se debe esperar que el FS se elimine del organismo y así entonces el paciente pueda retomar sus actividades habituales, con exposición a luz tanto solar como artificial. La Figura 1.11 presenta un esquema simplificado de la aplicación de TFD en la clínica.

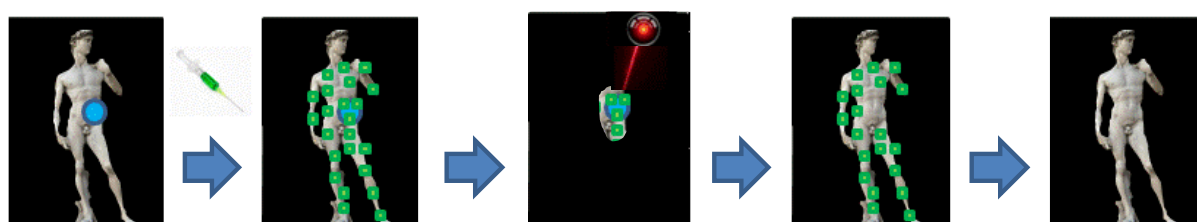


Figura 1.11. Esquema de aplicación clínica de la TFD. Al paciente alojado en un cuarto oscuro se le administra el FS por la vía de elección. Luego de transcurrido el tiempo necesario para que el FS se encuentre en cantidad suficiente en el tejido a tratar, se realiza la irradiación puntual de este tejido. Así, se desencadena la producción de especies citotóxicas con la consiguiente muerte celular. Finalmente, resta que el FS se depure del organismo y el paciente puede retomar su normal exposición a distintas fuentes de luz.

A nivel molecular, la irradiación producida durante la terapia entrega la energía necesaria para que electrones del FS en niveles basales (FS^0) puedan promoverse a un nivel energético mayor ($^1FS^*$). Durante este proceso el FS pasa de un estado singlete basal a un estado singlete excitado de corta vida media. La pérdida de energía que provoca el retorno del electrón del nivel excitado al nivel de energía basal puede implicar emisión lumínica (proceso de fluorescencia) o un cruce entre sistemas para dar lugar a la especie $^3FS^*$, en estado de triplete excitado. La desexcitación de esta especie puede producirse acoplando esa energía principalmente a dos tipos de mecanismos: reacciones de Tipo I o reacciones de Tipo II (Ethirajan M. y col., 2011; Agostinis P. y col., 2011; Oliveira C.S. y col., 2011). En la reacciones de Tipo I, el FS participa en procesos de transferencia de electrones o hidrógeno con sustratos biológicos para formar radicales libres, que finalmente dan lugar a productos oxigenados como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) (Gomes A.T.P.C. y col., 2018). En la reacciones de Tipo II, el oxígeno triplete estable (3O_2) se convierte en oxígeno singlete (1O_2), una especie altamente citotóxica de muy corta vida media, entre 100 ns en regiones lipídicas y 250 ns en el citosol. En consecuencia, el 1O_2 puede difundir en promedio 45 nm (Sharman W.M., 2000), una distancia que representa la milésima parte del diámetro de una célula eucariota. Esto lleva a postular que aquellas localizaciones intracelulares que alcance el FS antes de la irradiación se consideren los sitios principales donde se desencadena el daño fototóxico. Cabe agregar que cuanto más estable sea el FS, mayor número de ciclos de excitación-desexcitación podrá atravesar, generando por ende mayor cantidad de especies citotóxicas (Brown S.B. y col., 2004). El esquema representado en la Figura 1.12 detalla los eventos moleculares asociados con la irradiación de un FS.

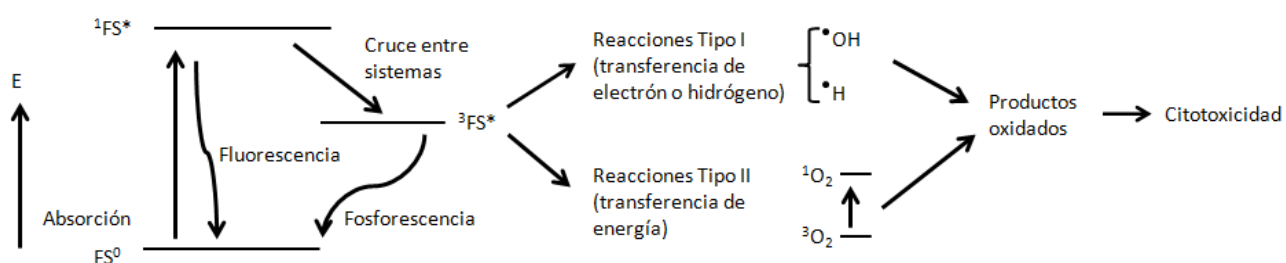


Figura 1.12. Diagrama de Jablonski representando eventos electrónicos asociados a la TFD.

En su conjunto, los efectos antitumorales de la TFD resultan de la combinación de tres mecanismos *in vivo* distintos: i) citotoxicidad sobre las células tumorales, ii) destrucción de la microvasculatura tumoral e iii) inducción de una respuesta inflamatoria antitumoral, aguda y local que provoca la activación del sistema inmune del paciente (Silva Z.S. y col., 2015).

1.2.2. Antecedentes.

Existen evidencias de que las primeras aproximaciones a la TFD fueron realizadas por civilizaciones antiguas, como las egipcias, indias y chinas. Se han encontrado alusiones incipientes a este tipo de terapias en textos antiguos como el tratado médico egipcio *Ebers Papyrus* (año 1500 antes de Cristo) y el *Atharvaveda* del hinduismo. A pesar de estos antecedentes, la observación de la sensibilización fotoquímica de tejidos fue realizada por primera vez en forma detallada por Raab en Alemania (Raab O., 1900) y al poco tiempo complementadas por von Tappeiner (von Tappeiner H., 1903), quien acuñó el concepto de “acción fotodinámica” (Kou J. y col., 2017). Ambos investigadores utilizaron administración tópica de eosina combinada con luz solar para tratar tumores de piel.

Más adelante, durante la década de 1970, la TFD generó un renovado interés en el campo académico a partir de la realización de ensayos sistematizados para la cura de tumores (Diamond I. y col., 1972). En paralelo, el grupo de trabajo de Dougherty introdujo conceptos que permitieron un mejor entendimiento del mecanismo citotóxico producido por la TFD, mediante ensayos exitosos en pacientes (Dougherty T.J. y col., 1975; Dougherty T.J. y col., 1978). El FS empleado fue el Photofrin®, cuya estructura se presenta en la Figura 1.13. Estos experimentos derivaron en la primera formulación aprobada para su aplicación en la clínica mediante TFD (Gomes A.T.P.C. y col., 2018).

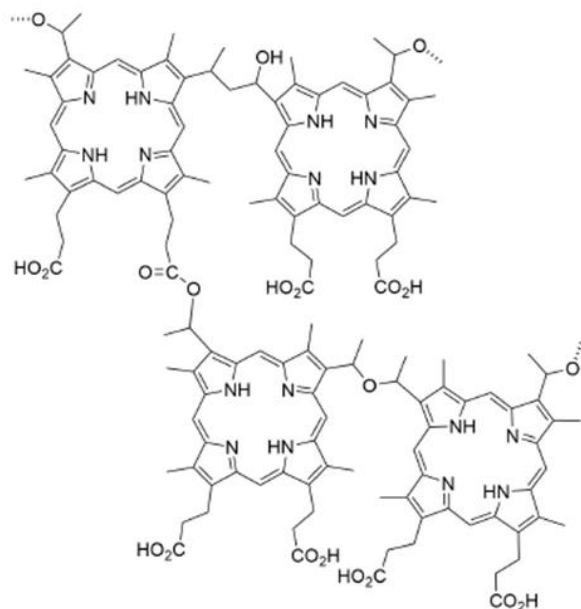


Figura 1.13. Estructura del Photofrin®. Figura adaptada de Gomes A.T.P.C. y col., 2018.

El Photofrin®, junto con otros derivados de porfirina, conformaron los llamados FSs de primera generación. Este grupo estaba constituido por mezclas de oligómeros y presentaba una serie de características poco favorables. Las más importantes eran su baja absorptividad

en el rango del rojo, su baja solubilidad en solventes polares y una prolongada fotosensibilidad (Gomes A.T.P.C. y col., 2018; Allison R.R. y Sibata C.H., 2010; Kou J. y col., 2017). Este último concepto refiere a que el FS persistía en el organismo durante tiempos prolongados. En consecuencia, el paciente debía tomar extremos recaudos relativos a su exposición a diversas fuentes de luz una vez finalizado el tratamiento.

Los FSs de segunda generación surgieron ya sea a partir de modificaciones estructurales realizadas sobre los de primera generación, o bien a partir de modificaciones en las rutas de síntesis que dieron lugar a nuevas familias de moléculas. Estos nuevos compuestos se asemejaban, en mayor medida que los de primera generación, a lo esperado para un FS ideal. Así surgieron como FSs las clorinas, bacterioclorinas, benzoporfirinas, purpurinas, texafirinas y ftalocianinas (Gomes A.T.P.C. y col., 2018; Kou J. y col., 2017).

Finalmente, los FSs de tercera generación son aquellos en los que se realizan modificaciones para alcanzar una mayor especificidad de acumulación en el tumor. Las principales estrategias abordadas para alcanzar este objetivo implican la unión de anticuerpos a los FSs (Kudarha R.R. y Sawant K.K., 2017; Pereira P.M.R. y col., 2014a) o bien su vehiculización en *carriers* (Abrahamse H. y col., 2017; Yang Y.M. y col., 2017).

1.2.3. Aplicaciones y perspectivas.

La TFD es un tratamiento que ha demostrado resultados positivos en la investigación de una variedad de patologías oncológicas, cardiovasculares, dermatológicas y oftálmicas, así como en intervenciones quirúrgicas vasculares (Levy J.G. y Obochi M., 1996; Brovko L., 2010; Silva Z.S. y col., 2015). Actualmente, se encuentra en uso en la clínica para el tratamiento de infecciones bacterianas, con la ventaja sobre los tratamientos clásicos con antibióticos de que no se genera resistencia (Brovko L., 2010).

En el campo de la oncología clínica, varios protocolos de TFD se utilizan rutinariamente (Agostinis P. y col., 2011; Detty M.R. y col., 2004). Un resumen de los mismos se presenta en la Tabla 1.7. Dentro de estos FSs se destaca el Photofrin®, aceptado para su uso clínico en 1995. Fue el primero en ser aprobado para TFD, y hoy en día se utiliza a nivel mundial para el tratamiento de tumores pulmonares, esofágicos y otros. Aún así, una de las principales desventajas de las terapias actualmente en uso es la fotosensibilidad retardada, lo cual puede llevar a hiperpigmentación, eritema y edema (Mesquita M.Q. y col., 2018; Ogawara K. y Higaki K., 2017). Debido a esta razón, y al hecho de que aún al día de hoy no se ha encontrada una TFD adecuada para tratar la diversidad de tumores existentes, la investigación de nuevos FSs y nuevos enfoques terapéuticos resulta una tarea relevante.

Tabla 1.7. Fotosensibilizadores utilizados en la clínica.

FS	Longitud de onda de excitación (nm)	Aprobado	Indicación
Photofrin ®	630	A nivel mundial, retirado de la UE por razones comerciales	Displasia de alto grado en esófago de Barret. Cáncer de pulmón u obstructivo de esófago
5-ALA / Ameluz ® / Levulan ®	635	A nivel mundial	Queratosis actínica suave a moderada
Metvix ® / Metvixia ®	570 - 670	A nivel mundial	Carcinoma de células basales y queratosis actínica no hiperqueratósica
Temoporfin / mTHPC / Foscan ®	652	Europa	Cáncer de cabeza y cuello avanzado
Talaporfin / Npe6 / Laserphyrin ®	664	Japón	Cáncer de pulmón temprano
Verteporfin / Visudyne ®	690	A nivel mundial	Degeneración macular asociada a la edad

Adaptada de van Straten D. y col., 2017.

Más allá de las aplicaciones previamente mencionadas para la TFD, se está evaluando este tipo de protocolos en otras áreas. Por un lado, en forma análoga a su uso como antibacteriano, se están realizando investigaciones para aplicar la TFD en el tratamiento de otro tipo de infecciones, como las provocadas por hongos y virus (Brovko L., 2010). Asimismo, más allá del campo de la medicina, la TFD se encuentra bajo evaluación para su empleo en la esterilización de superficies o como método alternativo del uso de pesticidas (Brovko L., 2010). En este último caso, se prevé que la aplicación de la TFD podría presentar numerosas ventajas, como ser la presencia de una menor cantidad de compuestos remanentes dañinos para la salud humana y animal, como así también menores alteraciones sobre las características organolépticas y nutricionales de los cultivos.

1.2.4. Ventajas comparativas para su uso en oncología.

La TFD se diferencia de otras alternativas clásicas para el tratamiento de tumores por su alta selectividad, hecho que le confiere numerosas ventajas comparativas (Agostinis P. y col., 2011; Ethirajan M. y col., 2011). El protocolo de aplicación de la TFD implica que sólo se irradiarán las células tumorales, y a lo sumo algunas circundantes no tumorales, por lo que sólo en esta zona se producirá el efecto citotóxico del FS. Terapias clásicas, como la radio y quimioterapia, poseen la capacidad de dañar el tejido tumoral pero al mismo tiempo afectan tejido normal que no es blanco del tratamiento. Este daño inespecífico repercute en la aparición de numerosos efectos secundarios como alopecia, emesis, infertilidad, inmunodepresión y otros previamente mencionados. Por otro lado, a diferencia de la quimioterapia, en la TFD no se genera resistencia al tratamiento. Mientras que la extirpación quirúrgica de tumores es un procedimiento altamente invasivo y no aplicable a todo tipo de pacientes (ancianos por ejemplo), la TFD no cuenta con estas limitaciones. Por otro lado, se ha descrito que existe un componente inmunológico asociado a la TFD que contribuye a la erradicación tumoral y evita la reaparición de nuevos tumores (Jalili A. y col., 2004). Finalmente, en el caso del tratamiento de patologías cutáneas se producen cicatrices casi imperceptibles (Brown S.B. y col., 2004).

1.3. Fotosensibilizadores.

1.3.1. Características de un fotosensibilizador ideal.

La búsqueda de protocolos de TFD más eficaces ha llevado a definir una serie de características que debería exhibir un FS ideal. (Gomes A.T.P.C. y col., 2018; Kou J. y col., 2017). En primer lugar, el FS debe presentar alta absorción a altas longitudes de onda dentro del espectro visible, entre 700 y 800 nm. Este tipo de fotones no sólo se dispersan menos al interactuar con tejidos, sino que también tienen mayor capacidad de penetración (hasta 10 mm) ya que son absorbidos en mucho menor medida por ciertos componentes de los tejidos como melanina, aminoácidos, hemoglobina y ácidos nucleicos (Ethirajan M. y col., 2011; Moghissi K. y col., 2015). En la Tabla 1.8 se compara la capacidad de penetración de luz con distintas longitudes de onda.

Por otro lado, un FS ideal, luego de la irradiación, debe ser capaz de generar eficientemente oxígeno singlete, uno de los principales agentes citotóxicos que afectan la homeostasis celular. Si el FS no logra generar esta especie cuando se ensaya disuelto en un medio apropiado, en ausencia de células, difícilmente presente resultados alentadores en modelos celulares *in vitro* e *in vivo*.

El FS debe, además, ser estable a temperatura ambiente y fácil de sintetizar en caso de no ser un producto natural. Esto implica una ruta de síntesis de corta duración, con una técnica simple y de buen rendimiento.

Tabla 1.8. Longitud de onda de luz en el rango visible y profundidad de penetración (piel humana).

Color	Longitud de onda (nm)	Penetración (mm)
Rojo	622 - 780	4 - 10
Naranja	597 - 622	3 - 4
Amarillo	577 - 597	3
Verde	492 - 577	2
Azul	455 - 492	1
Violeta	390 - 455	1

Adaptada de Moghissi K. y col., 2015.

En cuanto a su aplicación pensando en la clínica, se requiere que los FSs sean potentes, de modo de emplear la mínima dosis posible para alcanzar el efecto deseado. A su vez, sólo luego de ser irradiado el FS debe ser citotóxico, y debe eliminarse del organismo lo más rápido posible una vez concluída la irradiación, evitando así la aparición de efectos secundarios no deseados.

1.3.2. Fotosensibilizadores en uso en Terapia Fotodinámica.

Los FSs empleados hoy en día en la clínica poseen núcleos de clorina, porfirina o precursores de porfirina como estructura química base. Nuevos FSs, basados en estas mismas estructuras, así como en ftalocianinas, benzoporfirinas, purpurinas, texafirinas y bacterioclorinas, están siendo evaluados en ensayos preclínicos y clínicos. En la Figura 1.14 se presentan las estructuras químicas base de los FSs más ampliamente utilizados.

1.3.3. Ftalocianinas y sus aplicaciones.

Las ftalocianinas (Pcs) son compuestos que se utilizan desde hace varias décadas en diversas áreas, incluyendo la industria textil, eléctrica, electrónica y fotográfica (Ethirajan M. y col., 2011). A nivel químico, se trata de macrociclos orgánicos, aromáticos y planares con estructura similar a las porfirinas de origen natural (Ayaz F. y col., 2018). Las Pcs están compuestas por cuatro unidades de isoindol unidas entre sí por átomos de hidrógeno en

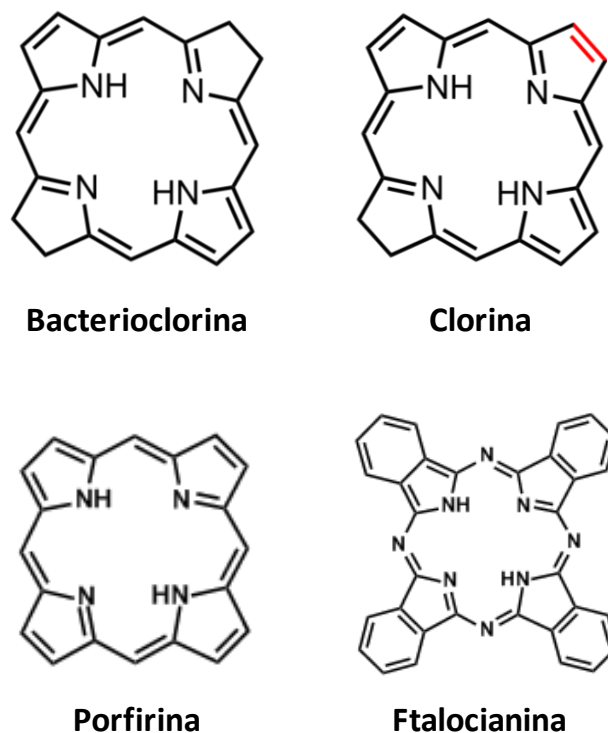


Figura 1.14. Principales estructuras químicas sobre las que se desarrollan FSs.

posición meso. Estos compuestos han sido identificados como FSs potenciales para usar en TFD debido a que poseen varias características que los asemejan a un FS ideal (Ayaz F. y col., 2018).

En primer lugar, las Pcs poseen altas absorptividades en longitudes de onda cercanas a 680 nm. Tienen la propiedad además de ser, por lo general, buenos generadores de oxígeno singlete y especies citotóxicas capaces de destruir células malignas. Asimismo, a nivel químico, esta familia de compuestos es reconocida por su alta estabilidad térmica. Así, para Pcs sustituidas, la temperatura inicial de degradación se encuentra entre 200 y 350°C, mientras que la temperatura a la cual se obtiene una degradación máxima está entre 320 y 450°C (Celenk Kaya E. y col., 2014). Por otro lado, las Pcs se sintetizan mediante una técnica poco laboriosa, sin requerir de numerosos intermediarios y con un óptimo rendimiento.

Una de las principales desventajas de este tipo de moléculas radica en su tendencia a la agregación (García Vior M.C. y col., 2013). Este fenómeno, que se atribuye a la asociación coplanar de las moléculas, reduce la tasa de generación de especies citotóxicas. Sin embargo, el mismo puede reducirse o evitarse incorporando el FS en vehículos apropiados.

1.3.4. Ftalocianinas de zinc(II).

Las Pcs poseen la capacidad de incorporar un heteroátomo que interacciona con los átomos de nitrógeno (Figura 1.15). El empleo de heteroátomos de tipo metal diamagnético

(Zn^{+2} , Al^{+3}) ha logrado mejorar la producción de oxígeno singlete en comparación con heteroátomos de tipo metal paramagnético (Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2}) (Sekkat N. y col., 2012). En líneas generales, se ha descrito que las Pcs de zinc(II) son buenas generadoras tanto de oxígeno singlete como de oxígeno triplete (Nyokong T. y Antunes E., 2010; Zamani A.R.N. y col., 2016).

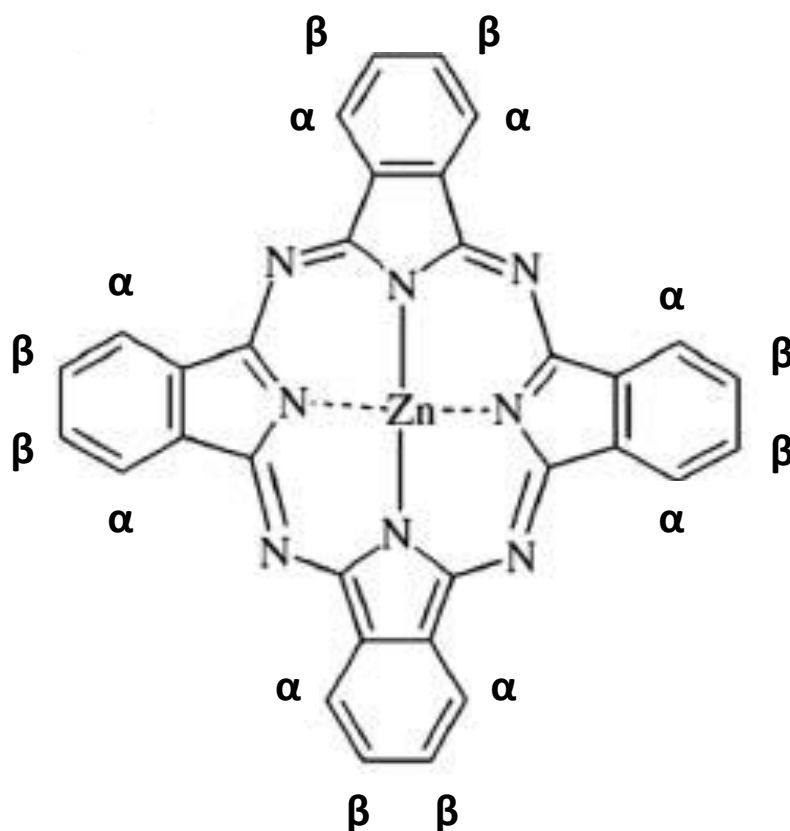


Figura 1.15. Estructura molecular de una ftalocianina de zinc(II). Figura adaptada de Ayaz F. y col., 2018.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se evaluó la potencia fototóxica de una serie de Pcs de Zn^{+2} en células KB, provenientes de un adenocarcinoma orofaríngeo. En primer lugar, se evaluaron dos ftalocianinas, denominadas Pc11 y Pc12, que tienen cadenas alifáticas unidas al macrociclo mediante oxígeno (Figura 1.16). Estos compuestos no presentaron efecto antitumoral (Marino J. y col., 2010). En cambio, sí se observó daño citotóxico al estudiar el efecto de otras dos Pcs (Pc13 y Pc14) en las que el átomo que une el macrociclo a la cadena alifática era un átomo de azufre. La diferencia entre estas Pcs radica en el hecho de que mientras Pc11 y Pc12 presentan sus sustituyentes en posición β , Pc13 y Pc14 los tienen en posición α (Figura 1.16).

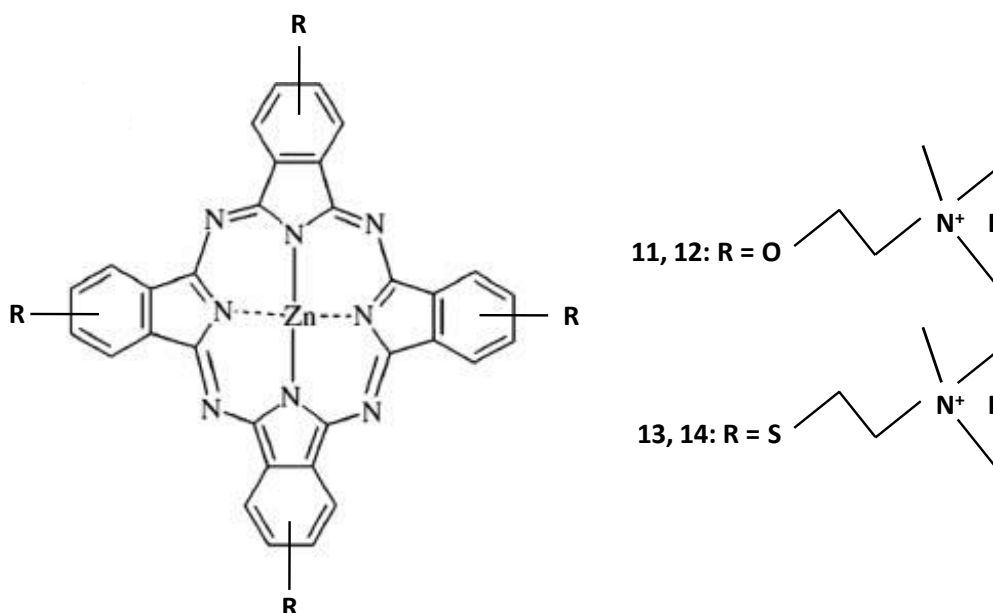


Figura 1.16. Estructura de las ftalocianinas de zinc(II) evaluadas en nuestro laboratorio.

1.4. Medios de vehiculización: micropartículas y sistemas nanotecnológicos.

El uso de vehículos o *carriers* para el transporte de sustancias de interés se encuentra extendido dentro de diversos campos, tales como medicina, cosmética, agricultura o industria alimenticia. La necesidad de vehiculizar fármacos surge de la baja solubilidad en agua que presentan muchos de ellos, característica que dificulta un esquema terapéutico de administración en la clínica. Los FSs no son la excepción, ya que la mayoría de ellos posee características hidrofóbicas. En consecuencia, numerosos grupos de investigación se abocan a proponer nuevas estrategias de tratamiento que aprovechen esta herramienta, desarrollando así FSs de tercera generación.

A nivel histórico, algunos autores identifican tres etapas o generaciones en el desarrollo de sistemas de vehiculización de fármacos (Kinam P., 2014). Dentro de la primera generación (1950-1980), los esfuerzos se enfocaron en el desarrollo de sistemas de liberación sostenida, mediante administración oral o transdérmica. Durante la segunda generación (1980-2010), los objetivos apuntaron a sistemas de liberación auto-regulados, nanotecnológicos y también de liberación extendida en el tiempo. En una tercera etapa (2010 en adelante), las investigaciones en el área se orientan a lograr el direccionamiento a un sitio específico y a mejorar la capacidad de predicción de la farmacocinética *in vivo* a partir de estudios *in vitro*.

1.4.1. Tipos de medios de vehiculización.

Idealmente, un sistema de vehiculización debe ser biocompatible, estable, no tóxico y no inmunogénico. Además, es deseable que favorezca la acumulación del fármaco en el tejido

de interés, así como que permita disminuir la agregación de la droga (Yi G. y col., 2018; Zhang Y. y col., 2018). En el campo de la TFD, en líneas generales, una menor agregación del FS implica una mayor capacidad de generar especies citotóxicas (Mesquita M.Q. y col., 2018).

Algunas ventajas alcanzadas en el campo de la oncología a través de la utilización de vehículos incluyen la solubilización de drogas hidrofóbicas, permitiendo de esta manera su administración por vía intravenosa; la liberación controlada; y la capacidad de acumulación en tumores (Yi G. y col., 2018). Esta última cualidad se logra gracias a que ciertos vehículos presentan efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, del inglés *Enhanced permeability and retention effect*). El mismo consiste en la capacidad de extravasar desde vasos en formación vecinos al tumor para alcanzar la masa tumoral, al mismo tiempo que su eliminación del tejido se realiza en forma más lenta a la habitual debido al reducido drenaje linfático presente en ese microambiente.

Dentro de los numerosos tipos de sistemas utilizados para la vehiculización de fármacos se pueden encontrar algunos de origen natural, como proteínas (lipoproteínas de alta y baja densidad, albúmina, transferrina, colágeno, queratina) y polisacáridos (ciclodextrinas, ácido hialurónico, quitosano, heparina). Entre los de origen sintético, los más utilizados son las emulsiones, hidrogeles, microcápsulas, partículas magnéticas, dendrímeros, liposomas y micelas. En la Figura 1.17 se esquematizan las estructuras utilizadas en los ensayos presentados en esta Tesis.

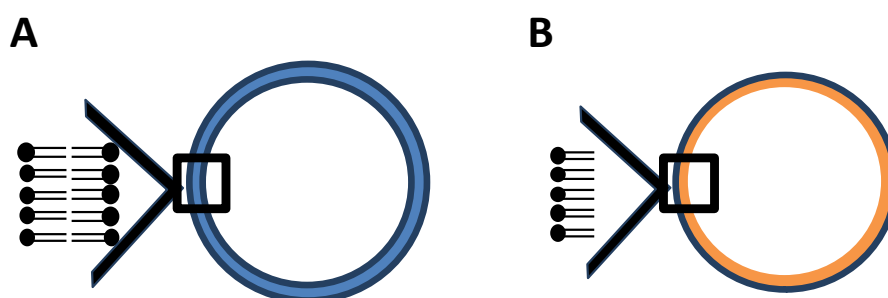


Figura 1.17. Estructuras de ciertos vehículos. (A) Liposomas unilamelares, compuestos por bicapa lipídica. (B) Micelas, compuestas por monocapa lipídica.

Varios de los sistemas previamente enumerados pueden producirse a escala “nano”, siendo este término utilizado para definir estructuras de tamaño menor a los 100 nm. Ha sido demostrado que preparaciones de este tipo presentan características físicas, químicas y biológicas únicas que las vuelven ventajosas con respecto a estructuras análogas de mayor tamaño (Abrahamse H. y col., 2017). Así, entre estas cualidades podemos mencionar una mejor incorporación en el tejido diana, y un menor reconocimiento por macrófagos del

torrente sanguíneo, propiedad que prolonga el tiempo de permanencia en circulación (Pelt J. y col., 2018; Fakayode O.J. y col., 2018).

1.4.2. Aplicaciones en oncología.

Dentro del área de la medicina, se han utilizado *carriers* para vehiculizar un gran número de moléculas con fines terapéuticos, entre las que se pueden nombrar agentes antimicrobianos como Anfotericina B (Pinto-Alphandary H. y col., 2000), ADN (Rao M. y Alving C.R., 2000), y proteínas (Nishikawa M. y Hashida M., 2002). También varios fármacos para el tratamiento de diabetes y patologías cardiovasculares, y quimioterápicos, como Doxorubicina y Daunorrubicina. En la Tabla 1.9 se muestran algunos ejemplos de combinaciones droga-*carrier* aprobados para su uso en la clínica. Las ventajas obtenidas a través de la estrategia de vehiculización incluyeron, en estos casos, lograr una mayor llegada al tumor, liberación controlada, aumentar el tiempo en circulación, una menor toxicidad sistémica o especificidad por células T.

1.4.3. Liposomas.

Los liposomas son estructuras esféricas compuestas por una bicapa lipídica que en su núcleo pueden incorporar distintos tipos de macromoléculas (Mesquita M.Q. y col., 2018). Su formación se genera a partir del auto-ensamblaje de las moléculas que lo componen y pueden clasificarse en unilamelares o multilamelares. Mientras que los primeros consisten en una única capa o lámina, los segundos están formados por varias capas, inserta cada una de ellas dentro de otra de mayor tamaño. A su vez, existen diversos tipos según el tamaño que alcancen, ya que se los suele dividir en liposomas pequeños (20 a 50 nm de diámetro) o vesículas (hasta 10 μ m). Debido a que los liposomas cuentan tanto con regiones hidrófobas como hidrófilas, fármacos altamente no polares pueden ser atrapados dentro de la bicapa hidrofóbica, donde se encontrará protegido de la posible degradación por enzimas, mientras que moléculas hidrófilas pueden ser incorporadas en las zonas de mayor polaridad.

La composición de los liposomas, que puede ser muy variada, determina su estabilidad y la capacidad de liberación de la droga que transporta. Asimismo, con el objetivo de evitar inconvenientes al momento de escalar la producción para el desarrollo farmacéutico, se

Tabla 1.9. Listado de terapias oncológicas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EEUU en las que el fármaco se encuentra vehiculizado.

Nombre	Vehículo	Indicación	Año de aprobación
DaunoXome ®	Liposoma	Sarcoma de Kaposi	1996
Doxil ® / Caelyx ®	Liposoma	Sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, mieloma múltiple	1995, 2005, 2008
Marquibo ®	Liposoma	Leucemia Linfoblástica aguda	2012
Onivyde ®	Liposoma	Cáncer pancreático	2015
Ontak ®	Micela	Linfoma cutáneo de células T	1999
Abraxane ®	Micela	Cáncer de mama, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas	2005, 2012, 2013
Eligard ®	Nanopartículas poliméricas de Ácido poli (D,L-láctico-co-glicólico)	Cáncer de próstata	2002
Nanotherm ®	Nanopartícula de hierro	Glioblastoma	2010

El vehículo de cada uno de los productos comerciales presenta una composición y características propias. Adaptada de Bobo D. y col, 2016.

prefiere la utilización de fosfolípidos de origen natural y no de aquellos sintéticos (van Hoogevest P. y Wendel A., 2014). Ha sido demostrado que el uso de colesterol y fosfolípidos saturados aumenta la rigidez de los liposomas y reduce la liberación de la droga que vehiculiza (Mesquita M.Q. y col., 2018). El colesterol, además, no sólo permite que aumente el tiempo en circulación del liposoma, sino que también favorece la llegada del liposoma al tumor. Esto se debe a que el colesterol promueve la unión de los liposomas a lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes en el torrente sanguíneo. Así, los liposomas tienden, en mayor medida, a alcanzar el tumor dado que el receptor para LDL se sobre-expresa en muchos tipos de tumores.

La fosfatidilcolina es el fosfolípido investigado en mayor profundidad y ha sido ampliamente estudiado para la obtención de liposomas. La mayoría de las formulaciones liposomales aprobadas para uso en humanos contiene este fosfolípido (Lian T. y Ho R.J.Y., 2001). La fluidez de esta molécula favorece la liberación de la droga transportada (Chen B. y col., 2005). Su capacidad de formar una especie Zwitteriónica permite disminuir su captación por el sistema retículo-endotelial, prolongando en consecuencia el tiempo en circulación. Otro lípido que cuenta con esta característica es la fosfatidiletanolamina. Además, esta molécula presenta gran versatilidad por la facilidad con la que puede modificarse químicamente su región hidrofílica.

Por otro lado, existen numerosas evidencias acerca de la inocuidad del polietilenglicol (PEG) como excipiente en formulaciones parenterales (Lian T. y Ho R.J.Y., 2001). La peguilación de la superficie liposomal puede disminuir la velocidad de eliminación de estas estructuras, así como favorecer la acumulación del quimioterápico en el tumor (Bobo D. y col., 2016; Ogawara K. e Higaki K., 2017). Mediante la incorporación en la superficie liposomal de polímeros como el PEG, o hidratos de carbono, se obtienen los denominados “liposomas *Stealth*”, que no se adhieren entre sí ni a células de la sangre o paredes vasculares, resultando así invisibles al sistema inmunológico (Nogueira E. y col., 2013; Yang G. y col., 2014).

Como se presentó en la Tabla 1.9, varias combinaciones de liposomas y fármacos se encuentran actualmente aprobadas por la FDA de EEUU para su utilización en la clínica. Se ha hecho uso de esta estrategia terapéutica debido a que al incorporar en estas estructuras un fármaco de interés se logran aumentar la biodisponibilidad, la eficacia y el índice terapéutico, mientras que se reduce la toxicidad. Debido a la similitud entre la composición de los liposomas y las membranas celulares, la difusión dentro de las células y la descarga del fármaco al citoplasma se ven facilitadas (Sneider A., y col., 2017). A pesar de estas características favorables, todavía es necesario avanzar en una serie de aspectos para lograr incrementar el número de formulaciones liposomales disponibles en el mercado. Para ello, los principales temas sobre los que se debe trabajar se relacionan con el costo de la preparación, la corta vida útil y la baja selectividad por el tejido diana (Zhang Y. y col., 2018). También se debe lograr aumentar la fuerza de las interacciones con ciertos medicamentos e incrementar la estabilidad de las preparaciones. Debido a esto, constantemente se evalúan nuevas formulaciones liposomales. En particular, en el campo de la TFD, se realizan esfuerzos desde la década de 1980. Los trabajos pioneros de Cozzani y Spikes abordaron la investigación de la vehiculización de hematoporfirina y Photofrin® en liposomas de L- α -dipalmitoilfosfatidilcolina (Spikes J.D., 1983; Cozzani I. y col., 1985).

1.4.4. Micelas.

Las micelas son estructuras compuestas por moléculas anfipáticas, las cuales se organizan formando una esfera a partir de la generación de una monocapa. Dentro de esta monocapa, la porción polar se orienta hacia el exterior. Esta región es la denominada “corona”. Por ende, las porciones no polares de estas moléculas conforman el núcleo hidrófobo de estos vehículos (Tong R. y Cheng J., 2007; Torchilin V.P., 2007). Entre las moléculas anfipáticas que pueden dar lugar a estructuras micelares se han descrito surfactantes convencionales, lípidos y polímeros (Letchford K. y Burt H., 2007). La interacción con el fármaco de interés se logra recurriendo a técnicas como diálisis (Kakizawa Y. y Kataoka K., 2002) o la generación de una emulsión (van Nostrum C.F., 2004).

Estas estructuras suelen ubicarse, debido a su diámetro menor a 100 nm, dentro del área de la nanotecnología. Gracias a esta característica, y a la hidrofiliidad de la corona, se evita su reconocimiento por macrófagos ya que su gran radio de curvatura impide la opsonización, prolongándose así su capacidad de mantenerse en circulación y alcanzar el tejido diana (Kwon G., 1994). Presentan otras propiedades favorables como la capacidad de aumentar la solubilidad y estabilidad de drogas lipofílicas (Moretton M.A. y col., 2014; Kahraman E. y col., 2015), y ciertos beneficios demostrados en modelos *in vivo* frente al fármaco no vehiculizado (Attia A.B.E. y col., 2011). Además, poseen una concentración micelar crítica (CMC) muy baja (Adams M.L., 2003) y son resistentes a procesos de dilución - aún por debajo de la CMC - como los que pueden ocurrir al introducirse al torrente sanguíneo. En su conjunto, estas características han propiciado el estudio de formulaciones micelares en los últimos años.

Un tipo particular de micelas son las denominadas “poliméricas”, que consisten en nanoestructuras generadas por el auto-ensamblaje de moléculas anfipáticas en concentraciones superiores a la CMC. La cualidad de “poliméricas” corresponde a que cada monómero de la micela es a su vez un polímero. Existen dos modos por los cuales un fármaco de interés puede incorporarse al núcleo de una micela polimérica (Yokoyama M., 2010). El primero consiste en el atrapamiento físico mediante interacciones hidrofóbicas. El segundo se basa en la conjugación química, a través de la generación de enlaces químicos entre la droga y la porción interna de las moléculas que forman la micela. Si bien en estos sistemas algunos fármacos pueden ejercer su efecto biológico unidos a la micela, en otros casos es muy relevante que se produzca la liberación de la droga para que ésta sea activa. Este tipo de micelas poliméricas presenta varias ventajas con respecto a micelas estándar, como las de polisorbato 80 o aceite de castor, ya que solubilizan drogas en forma más eficiente, son más seguras para su administración parenteral, poseen menor CMC y presentan mayor estabilidad al diluirse (Strickley R.G., 2004; Van Zuylen L., 2001). El

tiempo en circulación y el control de la velocidad de liberación del contenido puede ser regulado mediante la elección de los monómeros. Asimismo, presentan la posibilidad de ser químicamente modificadas de forma tal de maximizar su llegada al tejido diana (Alvarez-Lorenzo C. y col., 2010b).

Las poloxaminas son moléculas anfífilas con capacidad de formar micelas. Están compuestas por bloques de polietilénóxido (PEO) y polipropilénóxido (PPO). Dentro de esta familia de compuestos, se destacan las denominadas Pluronic® y Tetronic® (Figura 1.18). Las primeras son estructuras lineales compuestas por un bloque central de PPO unido a cada lado a un bloque de PEO. Las segundas poseen forma de equis. Su grupo etilendiamino central se encuentra unido a cuatro cadenas de PPO-PEO.

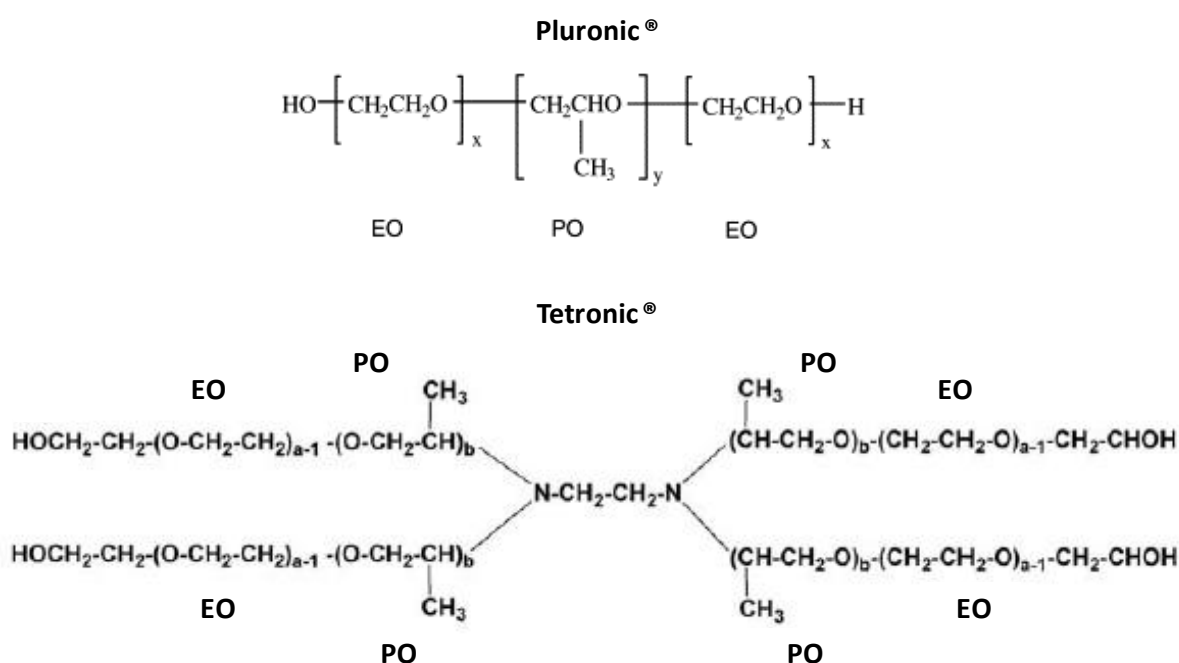


Figura 1.18. Estructura de las poloxaminas Pluronic® y Tetronic®. EO: etilénóxido, PO: propilénóxido. Figura adaptada de Kabanova A.V. y col., 2002.

La variación en el número de monómeros que componen las cadenas poliméricas determina las cualidades fisicoquímicas de las moléculas y, por ende, de las micelas formadas. Este tipo de estructuras, al agregarse para formar micelas, han demostrado una gran capacidad para mejorar la solubilidad y estabilidad de drogas (Gonzalez-López J., 2008; Alvarez-Lorenzo C. y col, 2010a). Inclusive, ciertas variedades de poloxaminas son capaces de aumentar la captación celular de la droga de interés, así como disminuir su eflujo una vez internalizada mediante el bloqueo de la glicoproteína-P (Ribeiro A. y col., 2012). Esta proteína, también conocida como MDR1 o ABCB1, se ha identificado como un mecanismo de defensa frente a sustancias xenobióticas, llegando en el caso de diversos

tipos de cánceres a ser responsable de su multirresistencia a fármacos. En la Tabla 1.10 se presentan los nombres y características de numerosas poloxaminas de tipo Pluronic® y Tetronic®.

Tabla 1.10. Listado de algunas poloxaminas comercializadas por BASF bajo el rótulo de Pluronic® y Tetronic®.

Micela Pluronic®	Unidades promedio de EO por bloque	Unidades promedio de PO por bloque	Micela Tetronic®	Unidades promedio de EO por bloque	Unidades promedio de PO por bloque
L10	7,3	49,7	304	3,7	4,3
L35	21,6	16,4	701	2,1	14,0
F38	83,6	15,9	901	2,7	18,2
P65	38,6	29,3	904	15,0	17,0
F68	152,7	29,0	908	114,0	21,0
F77	10,5	34,1	1107	60,0	20,0
L81	6,3	42,7	1301	4,0	26,0
P84	38,2	43,5	1304	21,4	27,1
P85	52,3	39,7	1307	72,0	23,0
F87	122,5	39,8	90R4	16,0	18,0
F108	265,5	50,3	150R1	5,0	30,0

Adaptada de Alvarez-Lorenzo C. y col, 2010b y Alvarez-Lorenzo C. y col, 2011. Las micelas evaluadas en la presente Tesis como vehículos para Pc9 en un protocolo de TFD son T304, T904, T1107 y T1307.

Objetivos

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad heterogénea que se presenta en el colon y el recto. La alta tasa de replicación del epitelio intestinal hace a este tejido proclive a la aparición de adenomas o pólipos adenomatosos que pueden sufrir transformaciones malignas para dar lugar al CCR. Es uno de los tumores gastrointestinales más usuales y representa el tercer tipo de tumor más prevalente a nivel global, afectando principalmente a países desarrollados y ubicándose en cuarto lugar dentro de las muertes por cáncer. En Argentina, representa el 12% del total de muertes por tumores malignos. Los tratamientos actuales para esta patología dependen, como en toda enfermedad oncológica, del estadio del tumor pero, básicamente, consisten en cirugía, quimioterapia y radioterapia. Los importantes efectos adversos asociados a estos tratamientos, junto con una tasa de respuesta insuficiente, impulsan la investigación de nuevas estrategias terapéuticas. En ese contexto, la terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento selectivo utilizado en el ámbito de la oncología clínica (Agostinis P. y col., 2011; Detty M.R. y col., 2004) que podría contribuir a superar o disminuir las complicaciones actuales en el tratamiento del CCR.

Las ftalocianinas (Pcs) son una familia de fotosensibilizadores (FSs) con potencial aplicación en TFD, ya que poseen varias características que las asemejan a un FS ideal. Entre ellas, podemos mencionar una alta absorción de luz en el rango de 700 - 800 nm, una eficiente generación de especies citotóxicas, y su obtención a través de un proceso de síntesis simple y poco costoso. Si bien se han realizado algunos ensayos clínicos con Pcs en TFD, estos compuestos no han sido aún evaluados como agentes terapéuticos en CCR, por lo que este tema permanece como una estrategia vacante de estudio dentro de la TFD (Kawczyk-Krupka A. y col., 2016).

En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es que el empleo de Pcs de zinc(II) como agentes fototóxicos en TFD puede constituir un abordaje terapéutico efectivo para el tratamiento del CCR.

El objetivo general de este trabajo consiste en estudiar las propiedades antitumorales tanto *in vitro* como *in vivo* de una ftalocianina de zinc(II) lipofílica (Pc9) para su uso como FS en protocolos de TFD dirigidos a combatir el CCR.

Los objetivos específicos son:

i) Determinar la eficacia *in vitro* de Pc9 incorporada en vehículos sobre líneas de células tumorales.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio identificaron a una ftalocianina hidrofílica, denominada Pc13, como un potente FS (Marino J. y col., 2013). Pc9 es un intermediario de síntesis de Pc13, que resulta ser más lipofílico y presenta ciertas características de un FS ideal. Con el fin de determinar si Pc9 posee potencial para ser aplicado en TFD, se evaluará su capacidad citotóxica en líneas de células tumorales. Dada

la naturaleza lipofílica de Pc9, se seleccionará posteriormente, entre una serie de liposomas y diferentes micelas, el vehículo más apropiado para su incorporación.

ii) Determinar la eficacia de Pc9 como agente fototóxico en modelos bidimensionales *in vitro* de CCR.

Teniendo en cuenta la relevancia epidemiológica mundial y nacional del CCR, y la posibilidad de realizar en una etapa posterior ensayos en modelos animales, una vez seleccionado un vehículo adecuado para Pc9, se investigará el efecto fototóxico de la formulación Pc9-*carrier* más potente en un panel de líneas celulares murinas y humanas de carcinoma colorrectal.

iii) Determinar el mecanismo de acción de Pc9.

Se evaluará la injuria generada por las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas luego de la irradiación del FS. Puesto que la localización intracelular del FS determina los sitios en los cuales se desencadena el proceso de muerte, se examinará la posible participación de los lisosomas, el retículo endoplásmico y/o las mitocondrias en el mecanismo de muerte. Asimismo, se investigará si la TFD conduce a una muerte celular de tipo apoptótica, y la posible contribución de la autofagia en respuesta al daño oxidativo.

iv) Determinar la eficacia de Pc9 en modelos tridimensionales y en un modelo *in vivo* de CCR.

Se utilizarán cultivos 3D de células provenientes de CCR (esferoides), y se evaluará la potencia *in vivo* del FS en un modelo murino singénico. En ambos modelos se investigará el mecanismo de acción de Pc9, y los ensayos *in vivo* se emplearán también para evaluar el posible efecto tóxico del tratamiento.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

Pepstatina A, PD 150606, 3-metiladenina (3-MA), el inhibidor de caspasa 8 Z-IETD-FMK, los anticuerpos monoclonales contra Catepsina D, Bax y procaspasa 12 y los anticuerpos policlonales contra PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), procaspasa 3, Calnexina, Hsp90, Actina, PARP-1, Bid, Bcl-2 y Bcl-X_L fueron comprados a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU). Los anticuerpos policlonales contra IgG de ratón o conejo conjugados con peroxidasa de rábano y el anticuerpo monoclonal contra IgG de conejo conjugado con FITC también fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology.

El proveedor del anticuerpo policlonal contra caspasa 3 fue Cell Signaling (Danvers, MA, EEUU). Los anticuerpos monoclonales contra Hsp70, GRP78/BIP y Hsp110 fueron adquiridos a Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EEUU). El anticuerpo monoclonal contra tubulina fue comprado a Abcam (Cambridge, MA, EEUU). El proveedor de los sustratos de caspasa 3 (Ac-DEVD-AMC), caspasa 8 (Z-IETD-AFC) y caspasa 9 (Ac-LEHD-AMC) fue Peptide Institute Incorporated (Ibaraki-shi, Osaka, Japón).

Las sondas naranja de acridina, Hoechst 33258, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6(3)), el colorante yoduro de propidio, los antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC) y ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroma-2-carboxílico (TROLOX), el inhibidor de serin-proteasas aprotinina, el quelante de calcio BAPTA-AM, la L- α -Fosfatidiletanolamina de yema de huevo Tipo III (PEEY), la L- α -Fosfatidilcolina de yema de huevo Tipo XVI-E (PCEY), la 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), el L- α -Fosfatidiletanolamina diestearoil metoxipolietilenglicol (DSPE-PEG), la 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), el Colesterol adecuado para cultivo celular (CHOL), el inhibidor de autofagia cloroquina (sal difosfato) (CQ), la p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida y el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) fueron obtenidos en Sigma Chemical (Saint Louis, MO, EEUU).

Las sondas Fluo-4 AM, MitoTracker Green FM, ER-Tracker Blue-White DPX y LysoTracker Green DND-26 fueron compradas a Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). El proveedor de CA-074 Me fue Enzo Life Sciences (Miami, FL, EEUU). El reactivo de Bradford fue adquirido a Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU).

Las micelas de poloxamina Tetronic ® 304 (T304), 904 (T904), 1107 (T1107) y 1307 (T1307) fueron un obsequio de BASF (Ludwigshafen am Rhein, Renania-Palatinado, Alemania). Los kits comerciales para la determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) fueron adquiridos en Wiener (Rosario, Santa Fe, Argentina).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

2.1.2. Ftalocianina 9.

La ftalocianina 9 (2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[(2-dimetilamino)etilsulfanil]ftalocianinato zinc(II) o Pc9) fue sintetizada en el laboratorio de la Dra. García Vior (IQUIFIB, Buenos Aires, Argentina) según la técnica descrita en Marino J. y col. (2010). Su estructura química se presenta en la Figura 2.1. La identificación del producto final fue realizada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , espectroscopía IR y espectroscopia de masa ESI-TOF (Marino J. y col., 2010).

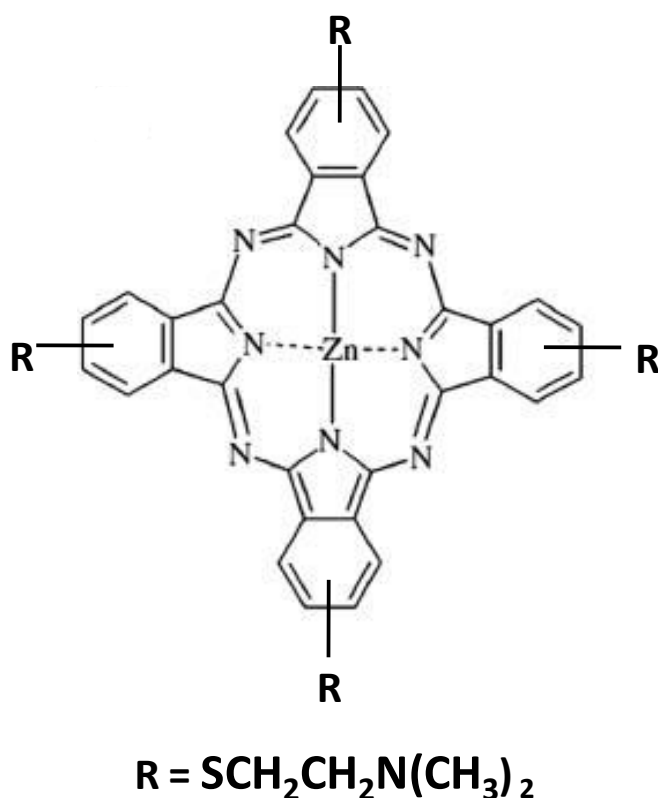


Figura 2.1. Estructura molecular de Pc9.

2.1.3. Micropartículas y sistemas nanotecnológicos.

2.1.3.1. Liposomas unilamelares.

La preparación de liposomas unilamelares, así como la incorporación de Pc9 en los mismos, fue realizada por nuestros colaboradores en el laboratorio de la Dra. Dicelio (INQUIMAE, Buenos Aires, Argentina) (López Zeballos N.C. y col., 2012). Brevemente, una alícuota de cada solución lipídica (Tabla 2.1) disuelta en solvente orgánico fue evaporada a 25°C hasta que se generó una delgada capa. Esta fue luego hidratada con una solución de HEPES 10 mM y cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,40. Todo el exceso de solvente orgánico fue removido durante la evaporación.

Los componentes utilizados para la generación de los liposomas se detallan en la Tabla 2.1. Comprenden la L- α -Fosfatidilcolina de yema de huevo Tipo XVI-E (PCEY), la L- α -Fosfatidiletanolamina de yema de huevo Tipo III (PEEY), el Colesterol (CHOL), la 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), la 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y el L- α -Fosfatidiletanolamina diestearoil metoxipolietilenglicol (DSPE-PEG).

Tabla 2.1. Composición y relación molar de los liposomas empleados.

Liposoma	Composición	Relación molar
M1	PCEY:PEEY:CHOL	16:16:1
M2	PCEY:PEEY	1:1
D1	DPPC:CHOL	24:1
D2	DPPC	1
S	DPPC:PCEY:PEEY:DSPE:CHOL	1:8:7:1:3
S-PEG	DPPC:PCEY:PEEY:DSPE-PEG:CHOL	1:8:7:1:3

La incorporación de Pc9 a los liposomas se realizó incubando el fotosensibilizador con los liposomas por al menos 20 min (López Zeballos N.C. y col., 2012).

2.1.3.2. Micelas de poloxamina.

Las micelas de poloxamina Tetronic ® (Figura 2.2) se encuentran formadas por polímeros constituidos por un grupo central etilendiamino unido covalentemente a 4 bloques de polipropilenóxido-polietilenóxido (PPO-PEO). Estas estructuras pueden presentar distinto número de monómeros (N) de propilenóxido (PO) y etilenóxido (EO) por cadena (Tabla 2.2).

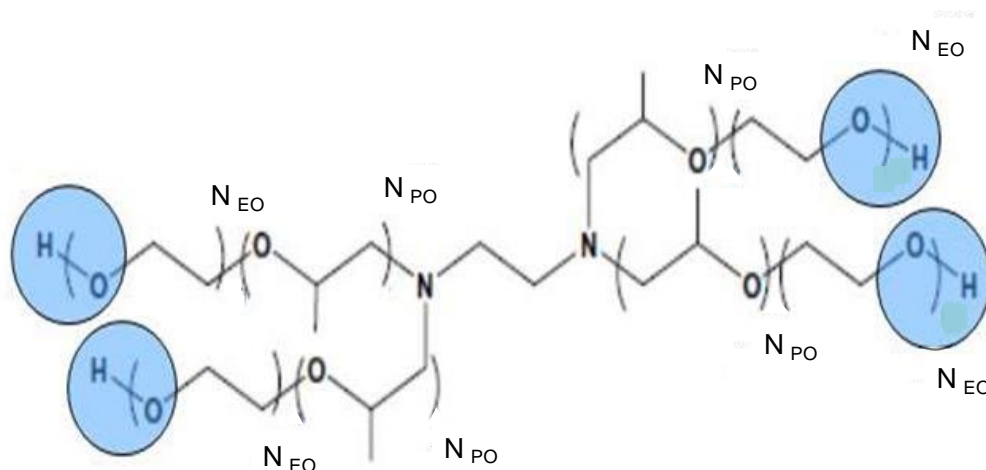


Figura 2.2. Estructura de micelas de poloxamina Tetronic ®. Las micelas de poloxamina pueden contener diferente número promedio de monómeros (N) de etilenóxido (EO) y propilenóxido (PO).

Tabla 2.2. Propiedades estructurales y fisicoquímicas de las micelas de poloxamina empleadas.

Copolímero	Peso Molecular (kDa)	N _{EO}	N _{PO}	BHL	CMC 25°C (% P/V)
T304	1,65	15,0	17,1	12-18	2,0
T904	6,70	60,9	69,3	12-18	0,5
T1107	15	238,6	77,6	18-23	0,5
T1307	18	286,4	93,1	>24	0,2-1,0

N_{EO}: número promedio de monómeros de etilenóxido por bloque de polietilenóxido, N_{PO}: número promedio de monómeros de propilenóxido por bloque de polipropilenóxido, BHL: balance hidrofílico-lipofílico, CMC: concentración micelar crítica.

La preparación de las micelas de poloxamina, así como la incorporación de Pc9 en las mismas, fue realizada por nuestros colaboradores en el laboratorio de la Dra. García Vior (IQUIFIB, Buenos Aires, Argentina) (García Vior M.C. y col., 2013). Brevemente, soluciones 10% P/V de cada micela fueron preparadas al disolver la cantidad requerida de copolímero en agua desionizada (pH 7,00 a 8,00) a 4°C. A continuación, el sistema se dejó estabilizar durante al menos 24 h a 25°C.

La incorporación de Pc9 a las micelas de poloxamina se realizó a partir del goteo de 200 µl de una solución 0,5 mM de Pc9 en acetona sobre cada uno de los sistemas micelares (5 ml), acompañado por agitación magnética. Luego, las muestras continuaron en agitación a 25°C durante 48 h y finalmente las suspensiones resultantes fueron filtradas a través de un filtro de nitrato de celulosa (0,45 µm como tamaño de poro) para remover la Pc9 insoluble remanente.

2.1.4. Líneas celulares.

Para las células de carcinoma nasofaríngeo humano KB (ATCC CCL-17) se utilizó el medio de crecimiento MEM (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% V/V (Gibco BRL), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 4 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. La línea celular se cultivó en una atmósfera 5% CO₂ a 37°C.

Las células de carcinoma de colon murino CT26 (ATCC CRL-2638) se cultivaron en medio de crecimiento RPMI-1640 (Gibco BRL) suplementado con SFB 10% V/V, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml.

Las líneas celulares de adecarcinoma colorrectal humano SW480 (ATCC CCL-228), HT-29 (ATCC HTB-38) y Caco-2 (ATCC HTB-37) se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM alta glucosa (Gibco BRL) suplementado con SFB 10% V/V, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml.

Cuando los cultivos llegaron a un 70-80% de confluencia, las células se desprendieron por tratamiento con 1 mM de EDTA y 0,25% P/V de tripsina en solución salina balanceada Hank's como solvente. Luego de retirar el medio de cultivo, las células se lavaron una vez con la solución de EDTA/tripsina/Hank's y se incubaron entre 2 y 5 min, según la línea celular, con la solución antes nombrada de EDTA/tripsina/Hank's. Posteriormente, las células se resuspendieron, se diluyeron en medio de crecimiento y se sembraron en material plástico adecuado para el protocolo experimental a desarrollar.

2.2. Métodos.

2.2.1. Ensayos *in vitro* en cultivos bidimensionales.

2.2.1.1. Determinación de proliferación celular y potencia citotóxica.

Las células KB o CT26 (2×10^4 por fosa) fueron sembradas en placas de 96 pocillos con RPMI-1640 suplementado con SFB 10% V/V e incubadas durante 24 h a 37°C hasta alcanzar una confluencia entre el 70 y 80%. Luego, el medio de cultivo fue reemplazado por medio conteniendo SFB 4% V/V y diferentes concentraciones de Pc9 disuelta en DMSO-agua o de las formulaciones liposomales o micelares. Tras 24 h las células fueron irradiadas con una lámpara de 150 W y potencia 1,17 mW.cm⁻² como se representa en la Figura 2.3.

Puesto que el producto de la potencia y el tiempo de irradiación es la energía utilizada, al emplear distintos tiempos de irradiación se consiguió incidir sobre las células distintas energías, si bien principalmente se utilizó $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$. Para atenuar la radiación infrarroja y el aumento de temperatura, se interpuso entre la lámpara y las células un filtro de agua de 1 cm de espesor. Además, se utilizó un filtro que permitió que sólo llegara a las células luz de longitud de onda mayor a 630 nm. Después de 24 h o distintos tiempos, la viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT (Mosmann T., 1983). Esta técnica colorimétrica se basa en la reducción de la sal de tetrazolio MTT por la acción de las enzimas oxidorreductasas mitocondriales NADPH dependientes, generándose así durante este proceso el producto violeta formazán. Al desarrollar la técnica, se agregaron 20 μl de una solución de MTT 5 mg/ml en cada pocillo y se incubó a 37°C durante 2 h. Luego, el medio de cultivo fue aspirado y el formazán solubilizado con una solución de HCl 0,04 N en isopropanol. La medición de la densidad óptica para cuantificar los niveles de formazán se realizó con un lector de placas Biotrak II (Amersham Biosciences, Piscataway, NY, EEUU). Como control, las células se analizaron también en la oscuridad. Los valores de IC_{50} , es decir, las concentraciones que inhibieron un 50% la viabilidad celular, se determinaron a partir de curvas dosis-respuesta, al graficarse porcentaje de viabilidad celular con respecto a células incubadas en ausencia de FS en función de la concentración de Pc9.

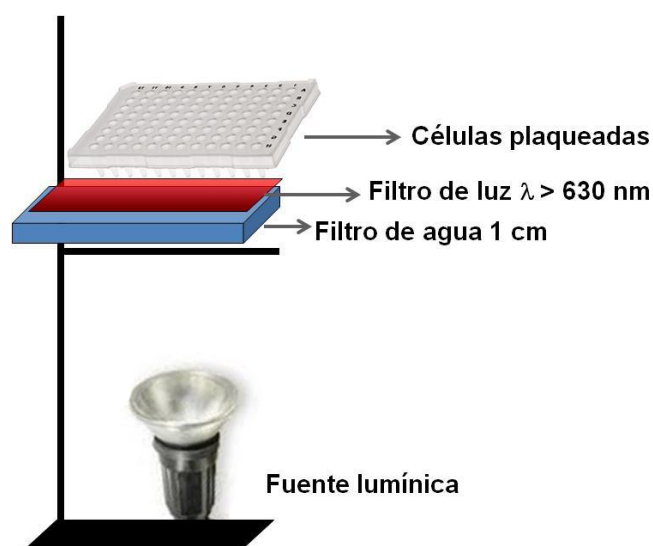


Figura 2.3. Esquema del dispositivo utilizado para irradiar sistemas *in vitro*. Las placas para cultivo celular conteniendo los cultivos bi o tridimensionales se ubican por encima de un filtro que sólo permite el paso de luz de longitud de onda mayor a 630 nm. Una capa de 1 cm de agua dentro del filtro evita el calentamiento de las células que podría producirse por efecto de la fuente lumínica ubicada en la base del dispositivo.

Alternativamente, antes de la irradiación las células fueron pre-incubadas durante 1 h con distintas concentraciones de antioxidantes (TROLOX o NAC), inhibidores de la actividad proteolítica (Pepstatina A, CA-074 Me o aprotinina), un quelante de calcio (BAPTA-AM), un inhibidor de caspasa 8 (Z-IETD-FMK) o inhibidores del proceso de autofagia (CQ o 3-MA). Cuando se utilizó el inhibidor de la actividad de calpaínas (PD 150606) el tiempo de incubación fue de 24 h. Una vez finalizada la irradiación, las células fueron incubadas durante 24 h y entonces se estimaron los porcentajes de viabilidad celular según el método de MTT como se explicó con anterioridad o por el método de la Hexosaminidasa (Landegren U., 1984), según corresponda. Brevemente, con este último método el número total de células se cuantifica determinando la actividad de la enzima lisosomal Hexosaminidasa. Las células fueron lavadas dos veces con PBS a 37°C y luego se incubaron durante 2 h a 37°C en una cámara húmeda con 60 µl de una solución conteniendo un sustrato de la Hexosaminidasa (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida 3,25 mM, disuelto en buffer citrato 50 mM, Tritón X-100 0,25% V/V, pH 5,00). Concluido este período de tiempo, se bloqueó la actividad enzimática y se desarrolló la reacción colorimétrica mediante el agregado de 90 µl de revelador (glicina 50 mM, EDTA 5 mM, pH 10,40) a la solución anterior. Finalmente, la absorbancia fue medida a 405 nm en un lector de placas Biotrak II. Los resultados se expresaron como el porcentaje de crecimiento celular con respecto al control (células incubadas en ausencia de Pc9-T1107). Este método fue elegido como alternativa al método de MTT para los ensayos en los que los inhibidores empleados podían actuar como agentes reductores, conduciendo por ende a la reducción de la sal de tetrazolio a formazán.

En una primera instancia, se realizó la puesta a punto del ensayo para cada línea celular. Con este objetivo, se sembraron distintas cantidades de células en placas de 96 pocillos y a las 72 h se realizó el revelado. Asimismo, se analizaron distintos tiempos de incubación con el sustrato para evaluar la cinética de generación del producto coloreado. Finalmente, la medición de la densidad óptica en esta variedad de condiciones permitió determinar la cantidad adecuada de células a sembrar y el tiempo conveniente de incubación con el sustrato para trabajar en un rango donde se cumpla la ley de Lambert y Beer.

2.2.1.2. Estimación de captación y liberación celular de Pc9.

Para estudiar el proceso de captación de Pc9 por células CT26, 1×10^6 células fueron incubadas en la oscuridad en placas de Petri de 35 mm de diámetro con una solución 20 nM de Pc9-T1107 durante distintos tiempos. Una vez finalizada la incubación, las células fueron cosechadas y resuspendidas en 300 µl de PBS. La captación de Pc9 también fue estimada en forma análoga en función de la concentración. Para ello, células CT26 fueron incubadas durante 24 h con distintas concentraciones de Pc9-T1107. Finalmente, la captación de Pc9

fue medida en ambos casos en células no fijadas utilizando un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EEUU) al excitar con luz de 640 nm y medir la emisión del FS a 675 nm. La cuantificación de los niveles de Pc9 fue realizada utilizando el programa propio del citómetro.

Con el objetivo de estimar la cinética de liberación de Pc9, $1,5 \times 10^5$ células CT26 fueron sembradas en placas de 6 pocillos e incubadas durante 24 h en medio de cultivo conteniendo SFB 4% V/V y Pc9-T1107 (200 nM). Luego, el medio de cultivo fue reemplazado por medio RPMI-1640 conteniendo SFB 10% V/V y las células se incubaron durante distintos tiempos. Tras la cosecha mediante tripsinización, las células CT26 fueron lisadas utilizando 250 μ l de dimetilformamida y sonicadas hasta obtener una solución traslúcida. La fluorescencia de Pc9, correspondiente a la cantidad de FS remanente en las células, fue monitoreada con un espectrofluorómetro Jasco FP-6500 (Jasco International, Hachioji, Tokio, Japón) excitando con luz de 691 nm y midiendo la emisión entre 695 - 750 nm. Con la finalidad de minimizar los efectos de filtro interno, todas las mediciones fueron realizadas en una cubeta de cuarzo de 3 mm de paso óptico. Las ventanas de excitación y de emisión fueron ajustadas en un ancho de banda de 3 nm.

2.2.1.3. Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno.

Las células CT26 (3×10^4) fueron sembradas en placas de 24 pocillos, o bien sobre vidrios en el caso de microscopía de fluorescencia, e incubadas durante 48 h. Luego, el medio de cultivo fue removido y reemplazado por medio de cultivo con SFB 4% V/V conteniendo concentraciones 1 μ M de las formulaciones liposomales (M1-Pc9, M2-Pc9, D1-Pc9, D2-Pc9, S-Pc9 y S-PEG-Pc9) o diferentes concentraciones de la formulación micelar Pc9-T1107. A las 24 h, las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 30 min con una solución 10 μ M de la sonda DCFH-DA. Esta molécula, que ingresa por difusión pasiva a las células, es hidrolizada por esterasas citoplasmáticas y así la sustancia resultante queda retenida en el citoplasma y puede ser oxidada por especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y O_2^- entre otras). Mientras que la forma reducida de este reactivo no es fluorescente, la forma oxidada (DCF) puede emitir en el rango del verde del espectro electromagnético visible. Tras remover la sonda, las células fueron irradiadas en presencia de medio de cultivo con SFB 10% V/V y posteriormente lisadas al incubarse a 37°C durante 30 min con Tritón X-100 0,1% V/V en PBS. La señal fluorescente correspondiente a DCF fue monitoreada con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón) o bien cuantificada con un fluorómetro PerkinElmer LS55 (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU) o un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus. En la cuantificación con fluorómetro, el contenido de ADN fue estimado tras incubar las células en la oscuridad con una solución 50 μ M de ioduro de propidio (IP). Para microscopía, la cuantificación de los niveles de

fluorescencia fue realizada utilizando el programa ImageJ, mientras que en el caso de citometría se utilizó el programa propio del citómetro.

2.2.1.4. Localización subcelular.

Las células CT26, crecidas sobre cubreobjetos, fueron incubadas en la oscuridad durante 24 h con alguna de las siguientes soluciones de liposomas o micelas: S-Pc9 2 μ M, S-PEG-Pc9 2 μ M o Pc9-T1107 100 nM. Luego de lavar con PBS, se agregó LysoTracker Green DND-26 (75 nM, 30 min), MitoTracker Green FM (100 nM, 45 min) (López Ceballos N.C. y col., 2013; García Vior M.C. y col., 2013) o ER-Tracker Blue-White DPX (400 nM, 30 min). Estas sondas fluorescentes organelo-específicas permiten identificar lisosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico, respectivamente. Las células fueron fijadas a temperatura ambiente durante 10 min con una solución 4% P/V de paraformaldehído (PFA) y luego examinadas con un microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV 300 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón). La Pc9 fue excitada con luz de 635 nm y la emisión se midió entre 655 - 755 nm. Los lisosomas y las mitocondrias se excitaron con luz de 473 nm y la emisión verde se detectó entre 485 - 545 nm, mientras que la sonda ERTracker Blue-White DPX se excitó con luz de 405 nm y la emisión azul se registró entre 425 - 460 nm. En otros ensayos, en los que no se utilizó ERTracker Blue-White DPX, los núcleos de las células fueron identificados utilizando Hoechst 33258 2 μ g/ml disuelto en el líquido de montaje (DABCO 23,3 mg/ml, Tris/HCl 20 mM, glicerol 90% V/V), excitando con luz de 405 nm y observando la emisión entre 425 - 460 nm. Cabe aclarar que en ninguno de estos ensayos las células fueron irradiadas, ya que el propósito era analizar la localización subcelular previa a la irradiación.

2.2.1.5. Microscopía de fluorescencia.

Las células CT26 crecidas sobre cubreobjetos se incubaron en la oscuridad en presencia o ausencia de una solución 20 nM de Pc9-1107 durante 24 h a 37°C. Luego de ser irradiadas, las células teñidas con naranja de acridina (5 μ M, 30 min, 37°C) se observaron a distintos tiempos post-irradiación (p.i.) con un microscopio de epifluorescencia Leica DM2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemania). Se utilizó el filtro de 450 - 490 nm para la excitación y la emisión se midió en longitudes de onda mayores a 515 nm. En algunos experimentos, las células fueron pre-incubadas durante la hora previa a la irradiación con una solución 5 mM del antioxidante TROLOX y teñidas con naranja de acridina 1 h p.i. Esta sonda permite evaluar la integridad de las membranas lisosomales, ya que en lisosomas intactos se percibe emisión de color naranja debido al pH ácido de esta organela.

Alternativamente, con el objetivo de marcar los núcleos de las células, inmediatamente luego de la incubación con Pc9-T1107 y de la irradiación, las mismas fueron lavadas en dos ocasiones con PBS y fijadas durante 10 min a temperatura ambiente con una solución 4% P/V de PFA. Tras remover el fijador y lavar con PBS, se agregó Hoechst 3325 2 µg/ml en el líquido de montaje y las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Olympus FV 300, siendo las longitudes de onda de excitación y emisión 405 nm y 425 - 460 nm respectivamente.

El uso de microscopía de epifluorescencia para cuantificar los niveles de ROS en células CT26 crecidas sobre cubreobjetos se describió previamente en la sección 2.2.1.3.

2.2.1.6. Obtención de la fracción citosólica para inmunodetección de Catepsina D.

Las células CT26 (2×10^6) tratadas con Pc9-T1107 (20 nM) e irradiadas, y los controles sin compuesto, se lisaron en un medio conteniendo sacarosa e inhibidores de proteasas (sacarosa 250 mM, HEPES 20 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 mg/ml, leupeptina 1 mg/ml, pH 7,50) utilizando un homogeneizador tipo Dounce. El lisado celular se centrifugó a $1.000 \times g$ durante 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a $20.000 \times g$ durante 20 min a 4°C. Alícuotas de 50 µg de proteína fueron luego analizadas por ensayos de *Western-Blot* (WB) como se detalla en la sección 2.2.1.8.

2.2.1.7. Obtención de lisados totales de cultivos bidimensionales para *Western-Blot*.

Las células CT26 ($1,5 \times 10^6$) fueron incubadas en Placas de Petri de 90 mm de diámetro durante 24 h con una concentración 10 nM o 20 nM de Pc9-T1107. Luego de lavar con PBS, las células se irradiaron con una energía lumínica de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$. Los lisados celulares se obtuvieron a distintos tiempos p.i., utilizando por cada 1×10^6 células 10 µl de buffer de lisis (Tritón X-100 0,5% V/V, aprotinina 1 µg/ml, inhibidor de tripsina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, $Na_4P_2O_7$ 10 mM, NaF 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,40). La incubación en el buffer se realizó durante 30 min a 4°C. Tras centrifugar a $17.000 \times g$ durante 10 min a 4°C se obtuvieron sobrenadantes traslúcidos. En algunos ensayos, las células fueron incubadas durante 24 h antes de la irradiación con PD 150606 (inhibidor de calpaínas) en una concentración 50 µM o bien durante 1 h con Pepstatina A (inhibidor de Catepsina D) en una concentración 80 µM, generándose en ambos casos los lisados 1 h luego de la irradiación.

2.2.1.8. Ensayos de *Western-Blot*.

2.2.1.8.1. Estimación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas de cada lisado celular se determinó por el método descrito por Bradford M.M. (1976). Brevemente, luego de diluir una alícuota del lisado en agua desionizada, se colocaron 20 µl/pocillo de cada solución por triplicado en placas de 96 pocillos. A continuación, se agregaron 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) y se incubó en la oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. La concentración de proteínas se determinó por medida de la absorbancia en 495 nm, utilizando seroalbúmina bovina (SAB) como patrón.

2.2.1.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Alícuotas de 100 µg de proteína fueron diluidas en buffer de siembra (Tris/HCl 0,063 M, SDS 2% P/V, glicerol 10% V/V, azul de bromofenol 0,05% P/V, 2-mercaptoetanol 5% V/V, pH 6,80) y calentadas a 100°C durante 3 min. Las muestras fueron sembradas, junto a un marcador comercial de peso molecular, en un gel de poliacrilamida en medio desnaturizante (SDS-PAGE) utilizando jeringa Hamilton. La concentración total de monómero del gel de pre-enfoque fue de 5% P/V, mientras que la del gel de resolución varió entre 8 y 16% P/V según el peso molecular de la proteína de interés. La corrida se realizó a 150 V durante 90 min utilizando un sistema de geles verticales Mini-Protean II Dual Slab Cell y una fuente de poder Power Pac 300 de Bio-Rad.

2.2.1.8.3. Electrotransferencia a membranas de difluoruro de polivinilideno e inmunodetección.

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas durante 1 h a 0,1 A a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activadas durante 1 min de incubación en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 195 mM, metanol 20% V/V, pH 8,20). Concluida la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau S para visualizar las calles y cortar las membranas según se requiriera. A continuación, se realizaron lavados con agua hasta que la totalidad del colorante se disoció de la membrana. Luego de bloquear los sitios de unión inespecíficos con un buffer de bloqueo TBS-T con SAB al 3% P/V (Tris 10 mM, NaCl 130 mM, Tween 20 0,05% V/V, SAB 3% P/V, pH 7,40), las membranas se incubaron durante toda la noche con anticuerpos específicos primarios. Al día siguiente, tras 3 lavados de 10 min con TBS-T, la cantidad de anticuerpo primario unido fue determinada mediante el agregado durante 1 h de un anticuerpo secundario (inmunoglobulinas tipo G de cabra anti-ratón o anti-conejo conjugadas con peroxidasa de rábano). Tanto para los anticuerpos primarios como los secundarios, el solvente utilizado fue buffer TBS-T con SAB 1% P/V. Tras 3 nuevos lavados de 10 min con TBS-T, las proteínas inmunoreactivas fueron

detectadas utilizando el sistema de detección ECL Plus Pierce (Thermo Fisher Scientific Inc.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y la fluorescencia emitida fue captada mediante el sistema analizador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU). El control de igual cantidad de siembra de proteínas por calle (control de carga) fue confirmado mediante incubación de la membrana con un anticuerpo de ratón anti-tubulina o un anticuerpo de ratón anti-actina. La intensidad de las bandas fue cuantificada utilizando el programa Gel Pro Analyzer.

2.2.1.9. Determinación de los niveles intracelulares de calcio.

Para evaluar los niveles de Ca^{+2} intracelular, 2×10^4 células CT26 fueron crecidas en medio de cultivo suplementado con SFB 10% V/V durante 24 h hasta alcanzar un 70 a 80% de confluencia. Una vez alcanzadas las 24 h, el medio de cultivo fue retirado y se agregó medio de cultivo con SFB 4% V/V conteniendo distintas concentraciones de Pc9-T1107. Luego de 24 h, las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 30 min a 37°C con una solución 2 μM de Fluo-4 AM en RPMI-1640 sin SFB. Esta sonda, al ingresar a la célula, es clivada por esterasas y puede así unirse a Ca^{+2} citosólico, aumentando en más de 100 veces su capacidad de fluorescer. Una vez completada la incubación, las células fueron irradiadas o no con una energía de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$. En algunos experimentos, se realizó una pre-incubación durante la hora previa a la irradiación con una solución 5 mM del antioxidante TROLOX. La intensidad de emisión lumínica generada por Fluo-4 AM fue medida con un lector de placas FlexStation 3 (Molecular Devices Incorporated, San José, CA, EEUU) excitando con luz de 494 nm y cuantificando la emisión en 516 nm.

2.2.1.10. Determinación del potencial de membrana mitocondrial.

Con la finalidad de estimar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), células CT26 pre-incubadas durante 24 h en la oscuridad con una solución 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas con una energía de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$. A distintos tiempos p.i., las células fueron incubadas durante 20 min a 37°C con la sonda fluorescente sensible al potencial de membrana DiOC6(3). Esta es una sonda lipofílica y catiónica que se une a membranas mitocondriales, donde presenta su máxima capacidad de fluorescer. En células con membranas mitocondriales despolarizadas, por ende desorganizadas, la capacidad de unión disminuye y en consecuencia también lo hace la intensidad de emisión de luz verde por parte de DiOC6(3). La emisión específica de la sonda fue evaluada utilizando un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus en el canal FL-1 (longitudes de onda de excitación y emisión de 488 nm y 503 - 563 nm, respectivamente). El procesamiento de los datos fue realizado utilizando el programa propio del citómetro.

2.2.1.11. Determinación de la actividad de caspasas.

Para determinar la actividad de caspasas, cisteín-proteasas involucradas en el proceso apoptótico, las células CT26 fueron incubadas durante 24 h con una solución 20 nM de Pc9-T1107, irradiadas con una energía de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$ e incubadas durante distintos tiempos a 37°C . 1×10^7 células fueron entonces expuestas durante 30 min a 4°C a 50 μl de buffer de lisis (HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, EGTA 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 2 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$, pH 7,40). Luego de esta incubación, se realizaron tres ciclos de rápido congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento en baño termostático a 37°C para favorecer la lisis. Estos lisados fueron centrifugados a $17.000 \times g$ durante 15 min y la concentración de proteínas en el sobrenadante fue determinada mediante el método de Bradford como se detalló en la sección 2.2.1.8.1.

Alícuotas conteniendo 100 μg de proteínas fueron diluidas en el buffer del ensayo (HEPES 20 mM, NaCl 132 mM, KCl 6 mM, MgSO_4 1 mM, K_2HPO_4 1,2 mM, glicerol 20% V/V, DTT 5 mM, pH 7,40) e incubadas a 37°C durante 1 h con 50 μg del correspondiente sustrato fluorogénico para caspasa 3 (Ac-DEVD-AMC), caspasa 8 (Z-IETD-AFC) o caspasa 9 (Ac-LEHD-AMC). El clivaje de los sustratos fue monitoreado utilizando un fluorómetro SFM25 Konton (Konton Instruments, Munich, Baviera, Alemania), mediante la cuantificación de las moléculas fluorescentes AMC y AFC, excitando con luz de 355 o 400 nm y midiendo la emisión de luz de 460 o 555 nm, respectivamente. Se tuvieron en cuenta las consideraciones necesarias para minimizar los efectos de filtro interno comentadas en la sección 2.2.1.2. En algunos experimentos que involucraron la determinación de la actividad de caspasa 8, las células fueron incubadas antes de la irradiación durante 1 h con una solución 80 μM de Pepstatina A, un inhibidor de Cathepsina D.

2.2.1.12. Microscopía óptica.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la TFD sobre la morfología celular y el número de células, 2×10^4 células CT26 fueron incubadas durante 24 h en presencia o ausencia (control) de una solución 20 nM de Pc9-T1107. Tras el reemplazo del medio de cultivo conteniendo FS por medio sin FS y con SFB 10% V/V, las células fueron irradiadas y fotografiadas a distintos tiempos p.i. utilizando una cámara fotográfica acoplada a un microscopio de campo claro Nikon Eclipse 300 (Nikon, Minato, Tokio, Japón).

2.2.1.13. Determinación del contenido de ADN y análisis del ciclo celular.

Con el objetivo de evaluar la proporción de células hipodiploides, las células CT26 fueron incubadas durante 24 h en presencia o ausencia (control) de una solución 20 nM de Pc9-T1107. Luego de la irradiación ($2,8 \text{ J.cm}^{-2}$), las células incubadas durante diferentes períodos de tiempo, se tripsinizaron y lavaron con PBS frío. 1×10^6 células se fijaron durante

24 h con 1 ml de etanol 70% V/V a 4°C. A continuación, las células fueron lavadas con PBS, permeabilizadas y marcadas con una solución citrato de sodio 0,1% P/V, IP 50 µg/ml y Tritón X-100 0,1% V/V. La permeabilización de la membrana celular producida por el Tritón X-100 0,1% V/V permite el ingreso de IP a las células, donde se une y marca ADN. Luego de una incubación de 24 h a 4°C, el contenido de ADN hipodiploide fue evaluado mediante un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus y cuantificado utilizando el programa propio del citómetro.

Para evaluar si la TFD con Pc9-T1107 provocaba alteraciones en el progreso del ciclo celular, el tratamiento de las células se realizó como fue explicado en el párrafo anterior. La distribución de las células en una u otra fase del ciclo fue evaluada con el programa Cylchred.

2.2.2. Ensayos *in vitro* en cultivos tridimensionales.

2.2.2.1. Obtención de esferoides.

Para generar cultivos tridimensionales de células de carcinoma de colon murino CT26 se utilizó la técnica de *liquid overlay* (Friedrich J. y col., 2009). Para ello, placas de 96 pocillos con fondo en “U” fueron pre-tratadas al agregar y retirar 200 µl de agarosa líquida 1% P/V. Una vez solidificada la fina capa de agarosa remanente debido al enfriamiento, se agregaron 2×10^4 células CT26 que fueron monitoreadas mediante microscopía óptica a lo largo del tiempo. El pre-tratamiento con agarosa permitió que las células no se adhirieran a la placa y formasen un acúmulo, al favorecerse las interacciones célula-célula. Se consideró que los esferoides se encontraban óptimos para su uso 72 h luego de la siembra, momento en el que la masa de células se percibía compacta y con forma esférica. Los esferoides que no lograron cumplir estas condiciones fueron descartados y no se utilizaron para los ensayos posteriores.

2.2.2.2. Determinación de proliferación celular y potencia citotóxica.

Con el objetivo de determinar el efecto de Pc9-T1107 sobre la proliferación celular de los esferoides, 72 h luego de la siembra inicial se seleccionaron esferoides de forma y tamaño similar. Se transfirieron 5 esferoides a cada fosa de una placa de 24 pocillos, los cuales contenían medio de cultivo con SFB 4% V/V y distintas concentraciones de Pc9-T1107. Luego de 24 h de incubación, las células fueron irradiadas con una energía de $2,8 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$. En paralelo, esferoides no irradiados fueron utilizados para evaluar el efecto del FS en la oscuridad. Luego de 24 h de finalizada la irradiación, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de MTT. En el caso de los cultivos tridimensionales, se agregaron 100 µl de una solución 5 mg/ml de MTT en cada pocillo y se incubó a 37°C durante 2 h. Al cabo de este tiempo, los esferoides fueron transferidos a tubos eppendorfs y centrifugados a 500

x g durante 5 min. El sobrenadante fue descartado y se agregaron 500 µl de una solución de HCl 0,04 N en isopropanol. Tras sonicar hasta producir la lisis celular, 100 µl de cada lisado fue transferido por triplicado a una placa de 96 pocillos y la densidad óptica fue cuantificada con un lector de placas Biotrak II. El valor de IC₅₀ se determinó a partir de curvas dosis-respuesta.

2.2.2.3. Estimación del volumen de los esferoides.

Con el fin de estimar el volumen de los cultivos tridimensionales, se generaron esferoides de células CT26 como se comentó en la sección 2.2.2.1. Para poder obtener información individualizada de cada esferoide, los mismos fueron mantenidos durante todo el ensayo en las placas de 96 pocillos utilizadas para la obtención de los cultivos tridimensionales. Los esferoides, una vez seleccionados, fueron incubados durante 24 h con medio de cultivo sin FS (control) o bien con Pc9-T1107 en concentraciones iguales a la IC₅₀ (370 nM) o 5xIC₅₀ (1850 nM). Luego de la irradiación, se obtuvieron fotografías de los esferoides a distintos tiempos p.i. utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse 300 con una cámara fotográfica adosada. El medio de cultivo (RPMI-1640 con SFB al 10% V/V) fue reemplazado cada 3 días luego de la irradiación. Las fotografías fueron examinadas mediante el programa ImageJ, con el que se procedió a medir el diámetro de cada esferoide por triplicado y obtener un promedio. El volumen de los esferoides se calculó con la siguiente ecuación: $V = \frac{4}{3} \times \pi \times (d/2)^3$, en la que “V” representa el volumen y “d” el diámetro promedio de las tres mediciones.

2.2.2.4. Microscopía de fluorescencia.

Con el objetivo de evaluar el posible daño a nivel nuclear producido por Pc9-T1107, esferoides de células CT26 fueron incubados en placas de 24 pocillos durante 24 h con una concentración 370 o 740 nM de Pc9-T1107. Luego de 24 h de concluida la irradiación, los mismos fueron recolectados en tubos eppendorfs, lavados con 500 µl de PBS y fijados durante 10 min a 4°C con PFA 4% P/V. A continuación, los esferoides fueron nuevamente lavados con PBS e incubados durante 1 h a 37°C con 35 µl de Hoechst 33258 (2 µg/ml) disuelto en líquido de montaje (DABCO 23,3 mg/ml, Tris/HCl 20 mM, glicerol 90% V/V). Se lavó el líquido de montaje y las imágenes de fluorescencia de los esferoides fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Olympus FV 300, siendo las longitudes de onda de excitación y emisión 405 nm y 425 - 460 nm respectivamente.

2.2.2.5. Obtención de lisados totales de cultivos tridimensionales para *Western-Blot*.

Esferoides de células CT26 fueron incubados durante 24 h con Pc9-T1107 (740 nM), luego lavados con PBS y expuestos a una energía lumínica de 2,8 J.cm⁻². A distintos tiempos p.i. (18 o 24 h), los esferoides fueron incubados a 37°C con una solución de PBS-tripsina 0,25% P/V. Después de 10 min, la disgregación de los esferoides se completó mecánicamente y se agregó inmediatamente medio de cultivo con SFB 10% V/V para inhibir la acción de la tripsina. Suspensiones con 1x10⁶ células fueron lisadas durante 30 min a 4°C en 10 µl de buffer de lisis (detallado en la sección 2.2.1.7) y centrifugadas a 17.000 x g durante 10 min a 4°C, para obtener sobrenadantes traslúcidos. Los ensayos de *Western-Blot* fueron realizados como se especificó en la sección 2.2.1.8.

2.2.3. Ensayos *in vivo*.

2.2.3.1. Animales.

Todos los ensayos fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (CICUAL-FFyB-UBA). Ratones machos BALB/c, obtenidos del bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, fueron mantenidos bajo condiciones controladas y utilizados rutinariamente a las 9-11 semanas de vida, con un peso aproximado de 25 g. Tanto el alimento extrudado como el agua fueron administrados *ad libitum*.

2.2.3.2. Incorporación de Pc9 en el tumor.

Con el objetivo de desarrollar el protocolo experimental determinando el tiempo óptimo entre la administración del FS y la irradiación, se evaluó la fluorescencia de Pc9 en los animales administrados con Pc9-T1107 o solución fisiológica. El diseño detallado del ensayo *in vivo* se presenta en la sección 2.2.3.4. Luego de 24 h de la inyección, los animales se anestesiaron y se examinaron en un equipo de toma de imágenes Bruker Xtreme I (Billerica, MA, EEUU). La fluorescencia característica de Pc9 proveniente de los ratones fue monitoreada excitando el FS con luz de 690 nm y midiendo la emisión a 750 nm. Para confirmar la zona anatómica de la cual provenía la señal también se adquirieron imágenes de Rayos X.

A continuación, se procedió a sacrificar mediante dislocación cervical estos mismos ratones. Los tumores fueron extraídos quirúrgicamente y nuevamente analizados, ahora en forma aislada, utilizando el equipo Bruker Xtreme I.

Finalmente, los tumores fueron fijados en PFA 10% V/V disuelto en PBS (pH 7,40) durante al menos 24 h. Posteriormente, los órganos fueron deshidratados, incluidos en

parafina, cortados con un micrótopo en piezas de 5 µm de espesor y montados en portaobjetos recubiertos de silano 2% V/V. La fluorescencia de Pc9 fue monitoreada con un microscopio confocal Olympus FV 300, excitando con luz de longitud de onda de 635 nm y recuperando la emisión de luz con longitud de onda entre 655 - 755 nm.

Cabe aclarar que los animales no fueron irradiados durante este ensayo, ya que el objetivo fue evaluar la cantidad de Pc9 en los tumores a las 24 h post-administración del FS.

2.2.3.3. Determinación del tamaño de la muestra.

La determinación del mínimo número de ratones por grupo (n, tamaño de muestra) fue realizada en un ensayo piloto mediante aplicación del Test t de Student para dos muestras independientes, en las condiciones más exigentes para apreciar diferencia significativa en el volumen tumoral. El modelo tumoral se desarrolló como se explica en la sección 2.2.3.4. La ecuación utilizada fue $n = 1 + 2 \times c \times (s/d)^2$ siendo “c” un valor de tabla según el test estadístico seleccionado, “s” el desvío estándar en el ensayo piloto y “d” la mínima diferencia significativa requerida entre los dos grupos experimentales ensayados. El valor obtenido fue de 8 animales por grupo experimental.

2.2.3.4. Modelo tumoral murino.

Ratones Balb/c machos de 2 meses de edad fueron inyectados por vía subcutánea en su flanco inferior derecho con 1×10^5 células CT26 resuspendidas en 100 µl de medio de cultivo RPMI-1640 sin SFB. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño de 5 x 5 mm, los animales fueron separados en cuatro grupos (n = 8). Todos los animales fueron anestesiados utilizando una solución recién preparada de ketamina 80 mg/kg y xilacina 10 mg/kg en solución fisiológica estéril. Durante el efecto de la anestesia, la zona peritumoral fue depilada utilizando crema depilatoria comercial. Luego de asear cuidadosamente la zona, a los animales en los grupos I y II se les administró intratumoralmente (IT) 100 µl de solución fisiológica, mientras que a los animales en los grupos III y IV se les administró intratumoralmente 100 µl de Pc9-T1107 10 µM, correspondiente a una dosis de 35 µg/kg (Tabla 2.3). A partir de ese momento, las jaulas fueron cubiertas con un material opaco con el fin de minimizar la llegada de luz ambiental al interior de las mismas. 24 h después de la administración, los grupos II y IV fueron nuevamente anestesiados como se explicó anteriormente e inmovilizados a una superficie desinfectada utilizando cinta adherente hipoalergénica. A continuación, los roedores fueron irradiados durante 27 min con un láser de longitud de onda 650 nm y potencia 306 mW.cm⁻², dando como resultado una energía de irradiación de 500 J.cm⁻². Si bien la dispersión lumínica de los láseres es mínima, todo el cuerpo del animal, con excepción del tumor y la cabeza, fue cubierto con goma eva negra

durante la irradiación para evitar la llegada de luz al resto del organismo. En la Figura 2.4 se presenta una fotografía adquirida durante el proceso de irradiación de un ratón.

Tabla 2.3. Grupos de ratones Balb/c para ensayo *in vivo*.

Grupo	Administración de	Irradiación
I	Solución fisiológica	No
II	Solución fisiológica	Sí
III	Pc9-T1107	No
IV	Pc9-T1107	Sí

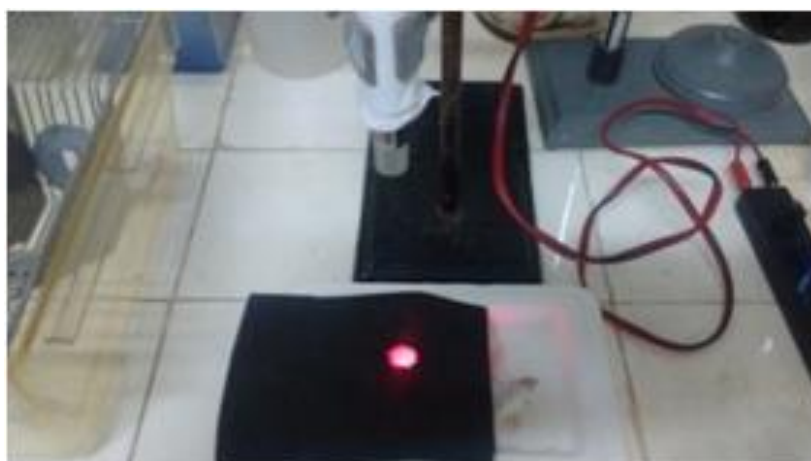


Figura 2.4. Esquema del dispositivo utilizado para realizar las irradiaciones en ratones Balb/c. Los animales anestesiados e inmovilizados fueron ubicados con la zona ventral orientada hacia arriba y cubiertos con goma eva negra, quedando expuestos el tumor y la cabeza del animal. El tumor fue puntualmente irradiado con un láser posicionado por encima del ratón.

Los ratones fueron finalmente sacrificados al tiempo p.i. seleccionado para el ensayo particular o cuando el estado general de los animales implicó que fuera éticamente inaceptable continuar con el experimento, debido al compromiso del bienestar animal. Las siguientes condiciones fueron consideradas críticas: tamaño del tumor mayor a 20 mm en cualquier dirección, tumor ulcerado, pérdida de peso mayor al 20% con respecto al inicio del tratamiento, comportamiento alterado, espalda arqueada, respiración agitada, baja temperatura, movilidad reducida y pelaje erizado. La Figura 2.5 presenta un esquema detallado del protocolo experimental.

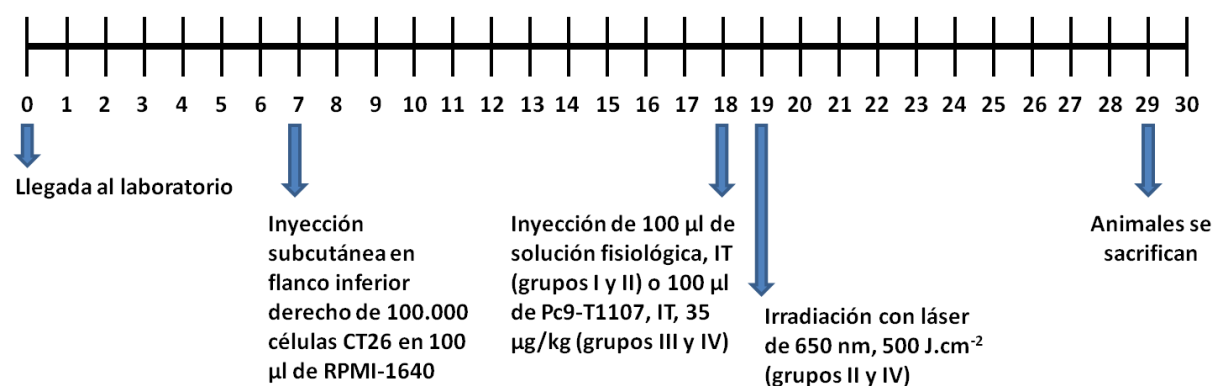


Figura 2.5. Representación esquemática del protocolo utilizado para el tratamiento *in vivo*.

2.2.3.5. Evaluación del volumen tumoral.

A partir de la inyección subcutánea de las células CT26 en los ratones Balb/c, y hasta la finalización del experimento, el tamaño tumoral fue monitoreado todos los días utilizando un calibre de aproximación 0,5 mm. Se realizaron mediciones tanto del largo (lado más largo) como del ancho (lado más corto) y se consideró que la profundidad era en todos los casos semejante al ancho. El volumen tumoral se calculó según la siguiente fórmula: $(\text{ancho})^2 \times \text{largo} \times 0,5$.

2.2.3.6. Cálculo de parámetros matemáticos indicadores de la eficacia de un tratamiento antitumoral.

El “Tiempo de Duplicación” (TD) fue determinado como el tiempo necesario para que el tamaño tumoral se duplicara, tomando como tiempo de referencia el momento de la irradiación. El parámetro “Índice de Retraso en el Crecimiento Tumoral” (IRCT) fue calculado como el cociente entre el tiempo de duplicación para animales tratados y el tiempo de duplicación para animales control (Ruzila I. y col., 2016). El parámetro “Inhibición del Crecimiento Tumoral” (ICT) representa la relación porcentual entre el tamaño tumoral relativo promedio en ratones tratados con respecto al tamaño tumoral relativo promedio en ratones control (Wu D. y col., 2013). Los valores de tamaño tumoral fueron obtenidos como se indicó en la sección 2.2.3.5.

2.2.3.7. Ensayo de sobrevida.

Para realizar el ensayo de sobrevida cada animal fue sacrificado en un día particular, atendiendo a los indicadores de bienestar animal nombrados en la sección 2.2.3.4. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism versión 5,0. Mediante análisis de Kaplan-Meier y estadístico de Gehan-Breslow-Wilcoxon se determinó si la TFD con Pc9-T1107 producía un incremento significativo en la sobrevida de los ratones.

2.2.3.8. Determinación de toxicidad sistémica.

Con el objetivo de determinar si la terapia producía efectos tóxicos generalizados, el peso de los animales fue monitoreado en forma regular. Esta medición fue realizada desde el día en que los ratones llegaron al laboratorio y hasta la finalización del experimento.

2.2.3.9. Determinación de toxicidad hepática.

Una vez finalizado el tratamiento en el día 29, se extrajo la sangre de los animales y posteriormente se obtuvieron los sueros correspondientes para evaluar un posible efecto de la TFD sobre el normal funcionamiento hepático. La toma de muestra se realizó mediante punción cardíaca, para lo cual los ratones fueron previamente anestesiados como se indicó en la sección 2.2.3.4. Inmediatamente concluida la extracción se procedió a sacrificar los animales mediante dislocación cervical. A continuación, la sangre obtenida fue centrifugada a 4.500 x g y 4°C durante 10 min. Una vez descartados aquellos sueros con hemólisis, se obtuvo una muestra representativa de cada condición (control y tratado) a partir de la mezcla de alícuotas de sueros de distintos animales. La actividad enzimática de ALT y AST se determinó luego mediante un método espectrofotométrico utilizando un kit comercial (laboratorios Wiener), según el protocolo recomendado por el fabricante.

Con el fin de determinar la proporción del peso corporal que representaba en cada caso el peso del hígado, el día 29 estos órganos fueron extraídos y pesados.

2.2.3.10. Evaluación de alteraciones histológicas en tejidos y tumores mediante microscopía óptica.

El día 29 diferentes tejidos (hígado, pulmón, bazo, cerebro, riñón, corazón e intestino) y los tumores fueron extraídos quirúrgicamente y fijados en PFA 10% V/V disuelto en PBS (pH 7,40), durante al menos 24 h. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados, incluidos en parafina, cortados con un micrótopo en piezas de 5 µm de espesor y montados en portaobjetos recubiertos de silano 2% V/V. Las piezas obtenidas fueron coloreadas con hematoxilina-eosina y examinadas posteriormente en un microscopio óptico Eclipse 2000 (Nikon, Minato, Tokio, Japón) con el objetivo de evaluar la posible presencia de alteraciones histológicas. En el caso de los tumores, utilizando una cámara fotográfica acoplada al microscopio se obtuvieron fotografías de 20 campos por corte tumoral. En cada imagen, mediante el programa ImageJ, se cuantificó el porcentaje de área histológicamente necrótica con respecto al área total del tejido.

2.2.3.11. Inmunofluorescencia.

Los tumores fueron extirpados el día 29 y procesados para obtener cortes en forma análoga a lo expuesto en la sección anterior. Se procedió luego a desparafinar los tejidos, para lo cual se realizaron incubaciones consecutivas con xilol (15 min), etanol 100% V/V (2 min), etanol 96% V/V (2 min), etanol 70% V/V (2 min) y etanol 50% V/V (2 min). El paso siguiente fue lograr la recuperación del antígeno, lo que requirió una incubación con ácido cítrico 10 mM (pH 6,00) durante 3 min a 92°C. Luego de lavar, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión mediante el agregado de SAB 5% en buffer Hank's modificado (MHB) durante 1 h. A continuación, los cortes fueron incubados durante 24 h en cámara húmeda con anticuerpos de conejo específicos para PCNA, Bcl-2, Bcl-X_L, Bax y caspasa 3. Tras nuevos lavados, se agregó durante 1 h el anticuerpo secundario de ratón anti-conejo con FITC incorporado como fluoróforo. Con el objetivo de marcar los núcleos, se realizó una incubación con Hoechst 33258 (2 µM) durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de lavar, se colocó una gota de líquido de montaje (DABCO 23,3 mg/ml, Tris/HCl 20 mM, glicerol 90% V/V) sobre el corte, se posicionó encima del mismo un cubreobjetos y se selló con esmalte. Finalmente, los tejidos fueron evaluados mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión 460 - 490 nm y 510 - 550 nm respectivamente.

2.2.3.12. Obtención de lisados totales tumorales para *Western-Blot*.

Una vez extraído el tumor y estimado su volumen, se realizó, empleando un homogeneizador, una disgregación mecánica a 4°C en 5 volúmenes de buffer (glicerol 10% V/V, Tritón X-100 0,5% V/V, aprotinina 1 µg/ml, inhibidor de tripsina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, Na₄P₂O₇ 10 mM, NaF 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,40). A continuación, se centrifugó durante 10 min a 3.000 x g y 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron luego durante 20 min a 20.000 x g y 4°C, recuperándose finalmente los nuevos sobrenadantes para ser sometidos a ensayos de WB, los cuales fueron realizados como se especificó en la sección 2.2.1.8.

2.2.4. Análisis estadístico.

Todos los valores se expresaron como la media ± error estándar (ES) de al menos tres determinaciones independientes. El análisis estadístico de los ensayos varió entre Test t de Student, al realizar comparaciones entre dos resultados experimentales, y ANOVA de una vía seguido por el test de comparaciones múltiples de Dunnett o Bonferroni, según correspondió, para analizar tres o más resultados.

El programa utilizado fue el GraphPad Prism versión 5,0, con el cual se tomó como valor de corte para definir variaciones estadísticamente significativas un p=0,05. Utilizando este

mismo programa se realizó la comparación en la sobrevida durante el ensayo *in vivo*, recurriendo a los tests de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Capítulo 3

Evaluación de la citotoxicidad de Pc9 en diferentes vehículos

3.1. Citotoxicidad de Pc9 disuelta en DMSO-agua.

Las ftalocianinas representan agentes fotosensibilizadores de interés para el tratamiento de tumores, en particular, por tener algunas de las características que las asemejan a los denominados “fotosensibilizadores ideales” (ver Introducción, sección 1.3.1) (Pandey R.K. y col., 2000; Ethirajan M. y col., 2011; Hamblin M.R. y Mróz P., 2008; Vicente M.G., 2001). La ftalocianina 9 (Pc9) es un intermediario de síntesis de la ftalocianina 13 (Pc13), un FS potente previamente caracterizado en nuestro laboratorio. Teniendo en cuenta que Pc9 es de naturaleza más lipofílica con respecto a Pc13, nos propusimos investigar su eficiencia citotóxica en diferentes tipos de sistemas de vehiculización, tales como liposomas y micelas. La incorporación de drogas en vehículos o *carriers* es una técnica ampliamente utilizada para mejorar la biodisponibilidad y eficacia de las terapias. Debido a que el fármaco de interés se encuentra de esta manera protegido de posibles degradaciones, se logran utilizar menores dosis, y así reducir la toxicidad y los efectos secundarios. El modelo tumoral elegido (células KB de adenocarcinoma orofaríngeo) permitió comparar la potencia de Pc9 con la de otras Pcs previamente estudiadas en nuestro laboratorio (Marino J. y col., 2010; Gauna G.A. y col., 2011).

A fines comparativos, decidimos evaluar, en primer lugar, la citotoxicidad de Pc9 no incorporada a algún tipo de *carrier*. Para ello, se utilizó una solución de Pc9 disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) 0,4% V/V. Diluciones seriadas de esta solución se incubaron con las células tumorales, con la precaución de que el porcentaje final V/V de DMSO en el medio de cultivo no fuera citotóxico *per se*. Por ende, puesto que concentraciones de DMSO mayores a 0,1% V/V pueden resultar citotóxicas, nos aseguramos de no superar este valor. Un grupo de células fue irradiado con una dosis de luz de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$, mientras que otro no irradiado se utilizó como control en la oscuridad. La viabilidad celular fue estimada mediante el método de MTT, y a partir de las curvas dosis-respuesta obtenidas se determinó el valor de IC_{50} , que representa la concentración de FS que inhibe un 50% la proliferación. Como se muestra en la Figura 3.1, Pc9 no resultó ser citotóxica en ausencia de irradiación en un rango de concentraciones entre 8 y 2000 nM. En cambio, cuando las células KB fueron irradiadas se observó una reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración de Pc9, siendo el valor de IC_{50} obtenido de $120 \pm 70 \text{ nM}$.

3.2. Liposomas.

Con el propósito de determinar si la vehiculización de Pc9 mejoraba su potencia como agente citotóxico, se recurrió en una primera etapa a evaluar la formulación Pc9-liposomas, empleando para ello 6 liposomas conformados por distintos tipos de lípidos. Los liposomas fueron denominados M1, M2, D1, D2, S y S-PEG. Su preparación y composición fueron presentadas en Materiales y Métodos (sección 2.1.3.1). También se investigó la producción

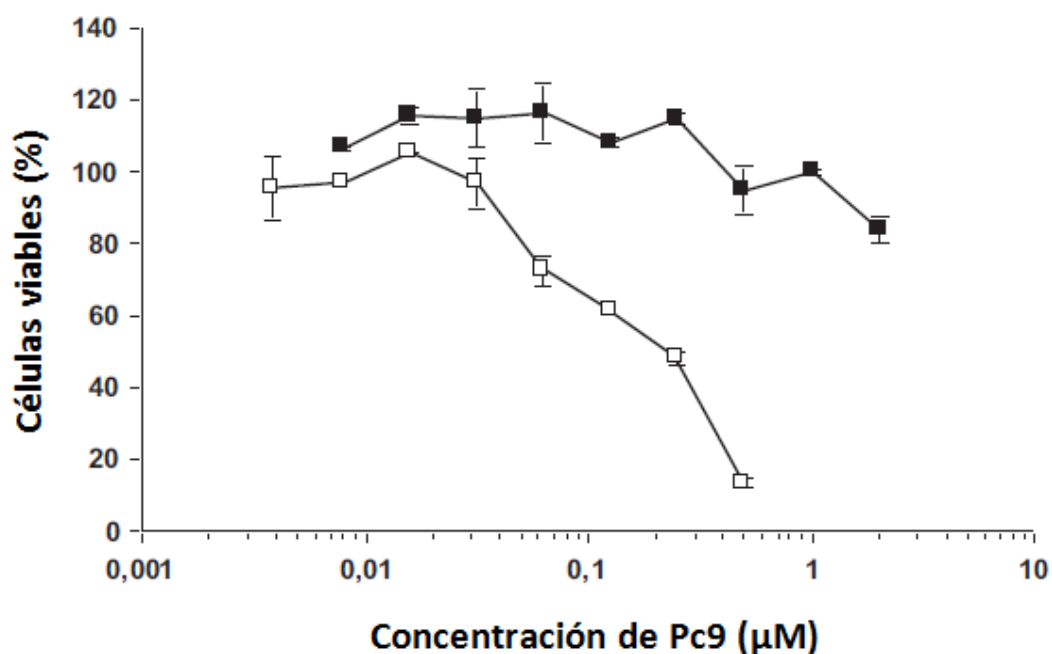


Figura 3.1. Efecto de Pc9 sobre la viabilidad de células KB. Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de Pc9 disuelta en DMSO-agua y luego de 24 h fueron irradiadas (□) o no (■) con una dosis de luz de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$ (□). La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT. Los resultados están expresados como el porcentaje de células viables con respecto al control (células incubadas en ausencia de Pc9), y representan la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

de ROS en dosis citotóxicas y la localización subcelular para algunas formulaciones antes de la irradiación.

3.2.1. Efecto de los liposomas sobre la proliferación celular.

En primer lugar se evaluó la posible toxicidad de los liposomas en ausencia de Pc9 incorporada. Para ello, se realizó un protocolo similar al enunciado en la sección 3.1, incubando las células KB con distintas concentraciones de cada uno de los liposomas y determinando luego la viabilidad celular.

Como se puede observar en la Figura 3.2, los liposomas “vacíos”, es decir, que no contienen el FS, no mostraron toxicidad ni en la oscuridad ni al ser irradiados en un rango de concentraciones entre 3 y 50 $\mu\text{g/ml}$. Las mismas concentraciones utilizadas en estos

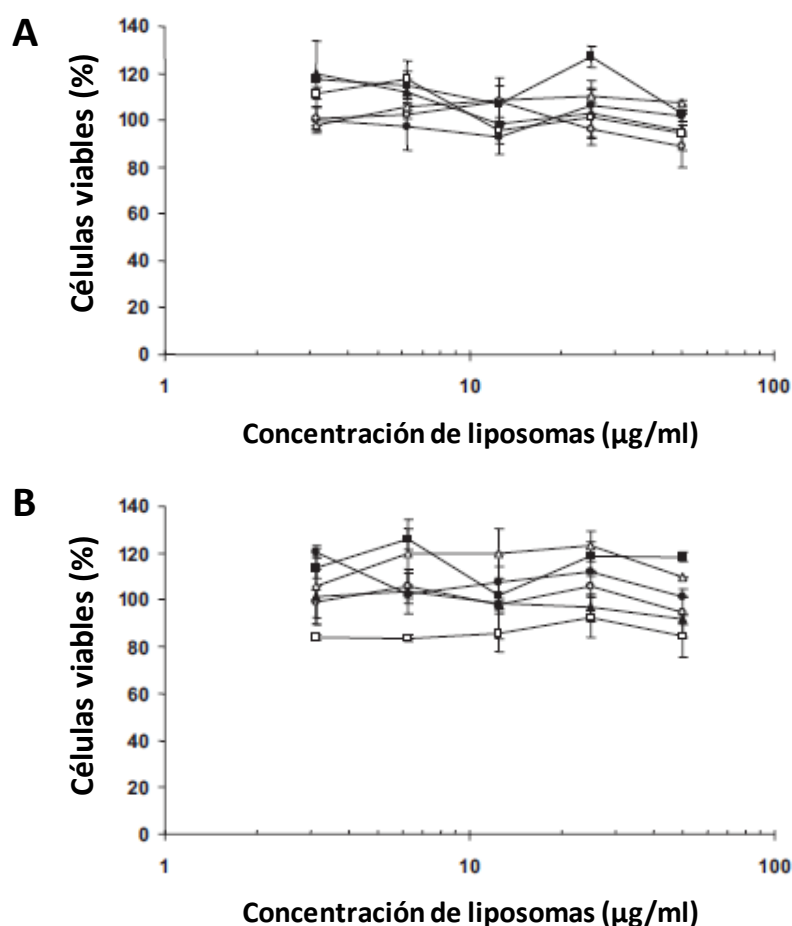


Figura 3.2. Efecto de la incubación con liposomas sobre la viabilidad de células KB. Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de los liposomas M1, M2, D1, D2, S y S-PEG. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT 24 h después de realizada la irradiación de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$ con luz roja (A). Las células se analizaron también en la oscuridad (B). Los resultados están expresados como el porcentaje de células viables con respecto al control (células incubadas en ausencia de Pc9), y representan la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. M1 (\blacktriangle), M2 (\triangle), D1 (\bullet), D2 (\circ), S (\blacksquare) y S-PEG (\square).

ensayos fueron posteriormente seleccionadas para evaluar el efecto de liposomas conteniendo Pc9 sobre la viabilidad de las células tumorales.

3.2.2. Efecto citotóxico de Pc9 vehiculizada en liposomas.

Una vez corroborado que los liposomas cumplen con la condición de no ser tóxicos *per se*, se procedió a incorporar Pc9 en los mismos y realizar los ensayos correspondientes de citotoxicidad, tanto en la oscuridad como luego de la irradiación.

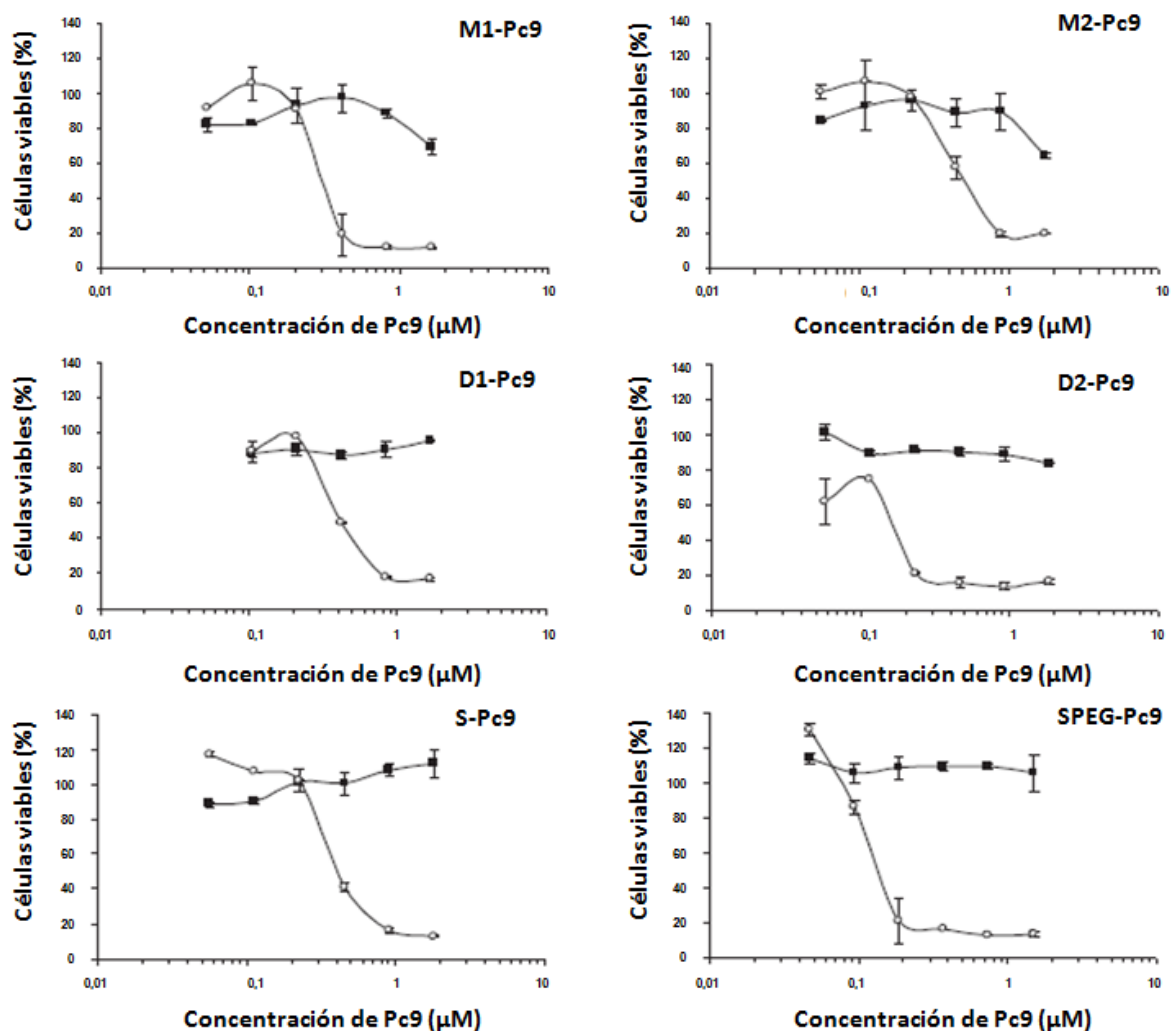


Figura 3.3. Efecto de formulaciones liposomales de Pc9 sobre la viabilidad de células KB. Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de las formulaciones liposomales M1-Pc9, M2-Pc9, D1-Pc9, D2-Pc9, S-Pc9 y S-PEG-Pc9. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT 24 h después de realizada la irradiación (○). Las células se analizaron también en la oscuridad (●). Los resultados están expresados como el porcentaje de células viables con respecto al control (células incubadas en ausencia de Pc9), y representan la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 3.3, el efecto sobre la viabilidad celular fue marcadamente distinto con y sin irradiación. Cuando las células se incubaron en la oscuridad, en la mayoría de las concentraciones evaluadas no se manifestó citotoxicidad, excepto para la mayor concentración ensayada (2 μ M) en los casos de M1-Pc9 y M2-Pc9. En cambio, cuando las células KB incubadas con distintas concentraciones de liposoma-Pc9 fueron irradiadas, se observó que concentraciones bajas de Pc9 no afectan la viabilidad celular, mientras que dosis mayores producen la muerte de casi la totalidad de las células. Los valores de IC₅₀ obtenidos se muestran en la Tabla 3.1. Las combinaciones más citotóxicas,

correspondientes a los valores de IC₅₀ más bajos, fueron las formulaciones M1-Pc9, D2-Pc9 y S-PEG-Pc9, mientras que el grupo conformado por M2-Pc9, D1-Pc9 y S-Pc9, resultó ser menos potente. De acuerdo con estos resultados, concluimos que el efecto citotóxico fue dependiente de la formulación liposomal empleada.

Tabla 3.1. IC₅₀ obtenidas para las formulaciones liposomales de Pc9 en células KB.

Liposoma	M1-Pc9	M2-Pc9	D1-Pc9	D2-Pc9	S-Pc9	S-PEG-Pc9
IC ₅₀ (nM)	300 ± 10	400 ± 10	470 ± 100	210 ± 70	400 ± 70	210 ± 120

3.2.3. Generación de ROS y localización subcelular de las combinaciones liposoma-Pc9.

Teniendo en cuenta que ha sido ampliamente reportado que las especies reactivas de oxígeno pueden generar daños a nivel celular que conllevan a la muerte, decidimos evaluar la capacidad de las distintas formulaciones liposoma-Pc9 de favorecer la formación intracelular

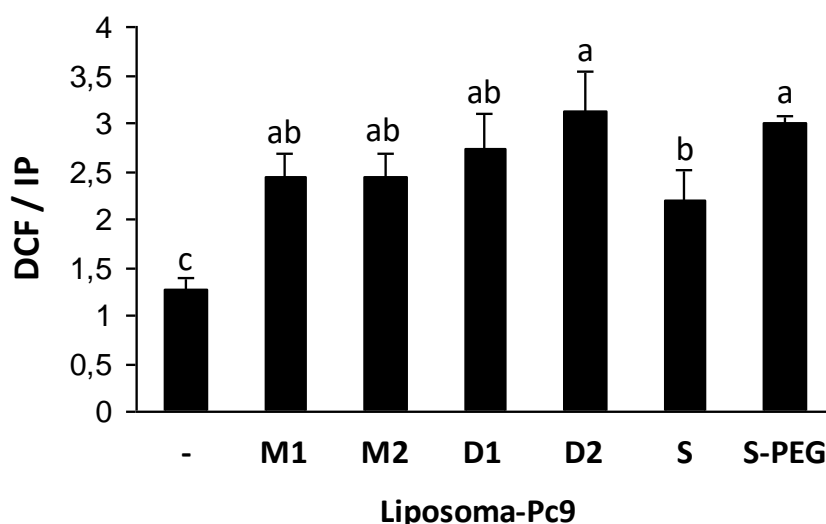


Figura 3.4. Efecto de formulaciones liposomales de Pc9 sobre la generación de ROS. 3x10⁵ células KB sembradas por pocillo fueron incubadas durante 24 h con una concentración 1 µM de las distintas formulaciones liposomales de Pc9. Luego de la irradiación, las células fueron incubadas a 37°C durante 30 min con una solución 10 µM de DCFH-DA. Tras retirar la sonda no incorporada, las células fueron solubilizadas y la fluorescencia de DCF fue cuantificada utilizando un fluorómetro. El contenido de DNA fue estimado luego de la incubación en oscuridad con una solución 50 µM de yoduro de propidio (IP). Los resultados se expresan como el cociente entre la señal correspondiente a DCF y la señal correspondiente a IP y representan la media ± ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, p<0,05.

de ROS (Dougherty T.J. y col., 1998; Henderson B.W. y Dougherty T.J., 1992; Sharman W.M. y col., 1999; Allison R.R. y col., 2010). Luego de la irradiación de células KB pre-incubadas con soluciones 1 μ M de liposoma-Pc9, la producción de ROS fue detectada utilizando la sonda 2',7'-Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA). Este compuesto se oxida en presencia de ROS generando Diclorofluoresceína (DCF), un fluoróforo con emisión de color verde.

Como se muestra en la Figura 3.4, en todos los casos se observó generación de ROS cuando las células se incubaron con una concentración 1 μ M de cada formulación, una concentración 2 a 5 veces mayor al valor de IC₅₀ de cada combinación. Asimismo, si bien se produjo un aumento significativo de los niveles de ROS al incubar las células con las distintas formulaciones liposomales, este aumento resultó ser significativamente menor para el liposoma S con respecto a los liposomas D2 y S-PEG, siendo estas dos últimas las combinaciones liposoma-Pc9 más potentes. Estos resultados indicaron una correlación directa entre la producción de ROS y la potencia fototóxica del FS.

Considerando que la combinación S-Pc9 se encuentra entre las menos potentes y la combinación S-PEG-Pc9 entre las más potentes, se decidió evaluar si esta diferencia en la citotoxicidad se debía a una distinta localización subcelular de Pc9 una vez incorporada a la célula. Utilizando microscopía confocal y distintas sondas organelo-específicas para núcleos, lisosomas y mitocondrias, se obtuvieron las fotografías presentadas en la Figura 3.5. Más allá de la combinación liposoma-Pc9 empleada, la distribución del FS fue en principio similar, ubicándose éste en regiones citoplasmáticas, pero no en núcleos. Al analizar las imágenes obtenidas por superposición de la señal roja de Pc9 y la señal verde de LysoTracker Green se visualizaron, para ambas formulaciones liposoma-Pc9, patrones amarillos, sugiriendo que Pc9 se ubicó principalmente en lisosomas. En cambio, en las imágenes de superposición de la fluorescencia roja de Pc9 y la fluorescencia verde de MitoTracker Green se aprecian por separado las mitocondrias y la zona de localización de Pc9, indicando que el FS no está presente en estas organelas.

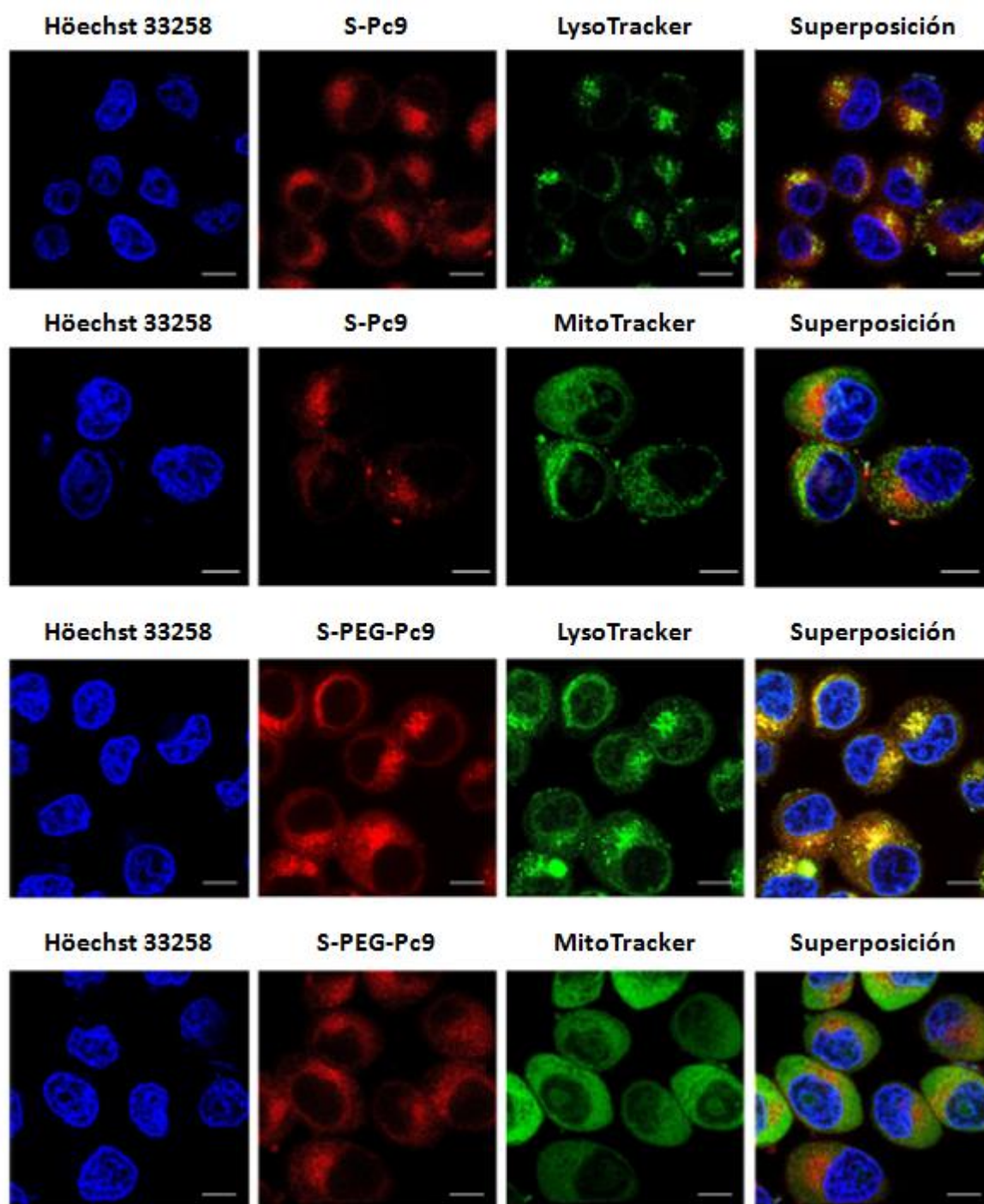


Figura 3.5. Localización intracelular de Pc9 vehiculizada en los liposomas S y S-PEG. Células KB expuestas durante 24 h a soluciones 2 μ M de S-Pc9 o S-PEG-Pc9 fueron luego incubadas con LysoTracker Green DND-26 (75 nM, 30 min) o MitoTracker Green FM (100 nM, 45 min). En la cuarta columna se presentan imágenes de superposición obtenidas a partir de la emisión de Pc9 (segunda columna) y la emisión de la sonda organelo-específica (tercera columna). Los núcleos celulares fueron visualizados con la sonda Hoechst 33258 (primera columna). Aumento: 2430X. Barra de referencia: 10 μ m.

3.3. Micelas.

Con el propósito de evaluar la potencia citotóxica de Pc9 vehiculizada en otro de tipo de *carrier*, se recurrió a 4 micelas de poloxamina Tetronic® comerciales: T304, T904, T1107 y T1307. El diferente número de monómeros de etilenóxido y propilenóxido que conforman cada una de las micelas les otorga propiedades distintivas en cuanto a volumen total, tamaño e hidrofobicidad del core, estabilidad, concentración micelar crítica, etc. Las características de las micelas empleadas fueron presentadas en Materiales y Métodos (Tabla 2.2). Luego de obtener los valores de IC₅₀ de distintas formulaciones, se determinó la localización subcelular de una de las combinaciones Pc9-micela.

3.3.1. Efecto de las micelas sobre la proliferación celular.

En primer lugar, se evaluó la posible toxicidad de las micelas en ausencia de Pc9 incorporada. Para ello, después de exponer las células KB a distintas concentraciones de los

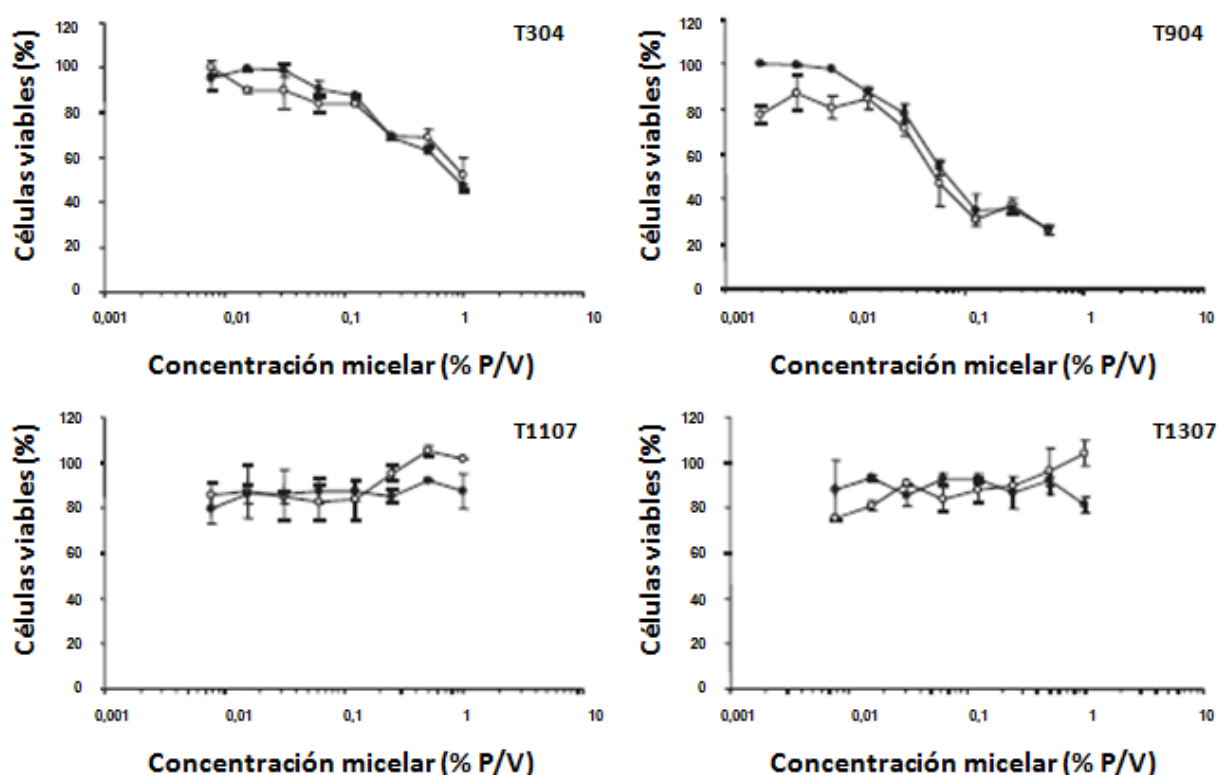


Figura 3.6. Efecto de distintas micelas sobre la viabilidad de células KB. Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de las micelas T304, T904, T1107 y T1307. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT 24 h después de realizada la irradiación (○). Como control, las células se analizaron también en la oscuridad (●). Los resultados están expresados como el porcentaje de células viables con respecto al control (células incubadas en ausencia de Pc9), y representan la media ± ES de al menos tres experimentos independientes.

vehículos, la viabilidad de las células, irradiadas o no, se determinó después de 24 h de incubación.

Como se observa en la Figura 3.6, el comportamiento de cada micela resultó similar tanto en la oscuridad como luego de la irradiación. Sin embargo, es importante destacar que la micela T304 presentó citotoxicidad en concentraciones mayores a 0,10% P/V, mientras que la micela T904 lo hizo en concentraciones más bajas, a partir de 0,02% P/V. Esta característica constituye una desventaja para seleccionar estas dos micelas para TFD debido a la posible toxicidad sistémica que implicaría administrar el FS incorporado en estos nanosistemas. Por el contrario, las micelas T1107 y T1307 no resultaron ser tóxicas, al menos, hasta una concentración 1% P/V. En consecuencia, T1107 y T1307 fueron seleccionadas para los estudios posteriores.

3.3.2. Efecto citotóxico de Pc9 vehiculizada en micelas.

Con el propósito de evaluar la citotoxicidad de las formulaciones Pc9-micelas, luego de incorporar el FS a los nanovehículos previamente seleccionados T1107 y T1307, se realizaron curvas dosis-respuesta a partir de soluciones 100 nM de Pc9. En el caso de T1107, la micela se encontraba en una concentración 0,10% P/V, mientras que para T1307 la concentración fue de 0,18% P/V.

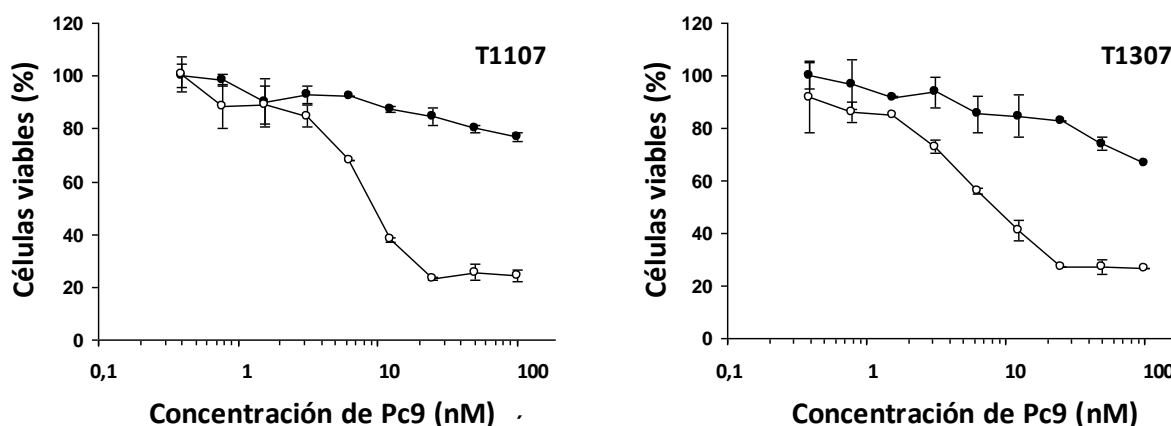


Figura 3.7. Efecto de formulaciones micelares de Pc9 sobre la viabilidad de células KB. Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de las formulaciones micelares Pc9-T1107 y Pc9-T1307. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT 24 h después de realizada la irradiación (○). Las células se analizaron también en la oscuridad (●). Los resultados están expresados como el porcentaje de células viables con respecto al control (células incubadas en ausencia de Pc9), y representan la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 3.7, se obtuvo un importante efecto fototóxico para ambas formulaciones, siendo los valores de IC_{50} calculados de 10 ± 1 nM para Pc9-T1107, y $9,5 \pm 0,7$ nM para Pc9-T1307.

3.3.3. Localización subcelular de Pc9-T1107.

La localización subcelular de Pc9 vehiculizada en micelas se evaluó mediante ensayos de microscopía confocal. Los mismos fueron realizados sólo con la formulación Pc9-T1107, que al tener una mayor fotoestabilidad con respecto a Pc9-T1307, resultó una combinación más atractiva para ser posteriormente estudiada en modelos celulares y animales más complejos.

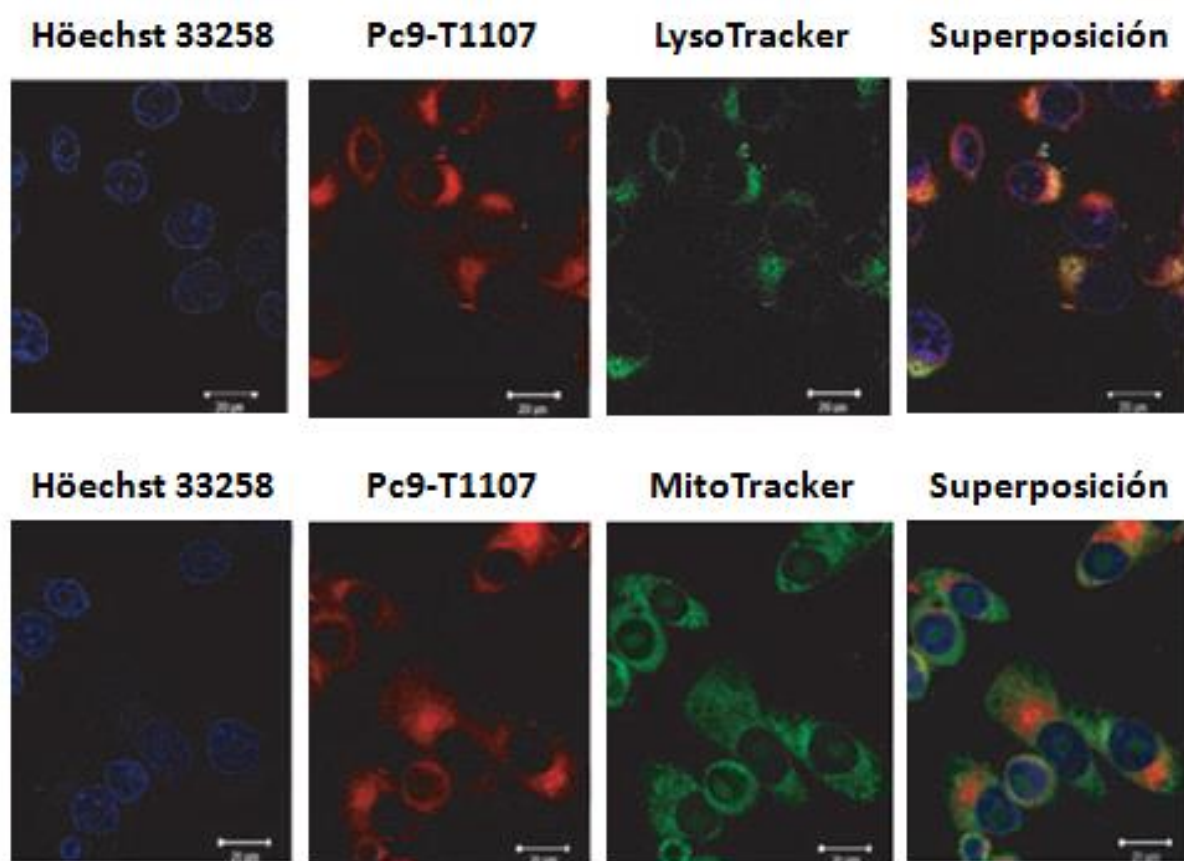


Figura 3.8. Localización intracelular de Pc9 vehiculizada en la micela T1107. Células KB expuestas durante 24 h a soluciones 100 nM de Pc9-T1107 fueron luego incubadas con LysoTracker Green DND-26 (75 nM, 30 min) o MitoTracker Green FM (100 nM, 45 min). En la cuarta columna se presentan imágenes de superposición obtenidas a partir de la emisión de Pc9 (segunda columna) y la emisión de la sonda organelo-específica (tercera columna). Los núcleos celulares fueron visualizados con la sonda Hoechst 33258 (primera columna). Barra de referencia: 20 µm.

Como se muestra en la Figura 3.8, la emisión roja de Pc9 y la emisión azul proveniente de Hoechst 33258 revelaron que el FS mantuvo una localización citoplasmática y no

penetró en los núcleos. En cuanto a la colocalización con marcadores de lisosomas o mitocondrias, se obtuvo la misma distribución que en el caso de los liposomas S y S-PEG. Debido a la presencia de un patrón amarillo en la imagen de superposición entre la emisión de Pc9 y la de LysoTracker, se concluyó que Pc9 se localiza en vesículas lisosomales, pero no en mitocondrias.

3.4. Discusión.

Con la finalidad de caracterizar FSs potentes para su aplicación en la clínica, decidimos evaluar la capacidad citotóxica de Pc9, un intermediario de síntesis lipofílico de una ftalocianina hidrofílica (Pc13) previamente caracterizada en nuestro laboratorio (Marino J. y col., 2010; Gauna G.A. y col., 2011). Demostramos que Pc9 no vehiculizada (disuelta en una solución acuosa de DMSO-agua) presentó una gran potencia citotóxica en células KB de adenocarcinoma orofaríngeo, con un valor de IC_{50} de 120 ± 70 nM. Pc9 evidenció ser alrededor de 20 veces más potente que Pc13 ($IC_{50} = 2,7 \pm 0,6$ μ M), y al no presentar toxicidad en la oscuridad cumplió con uno de los requisitos indispensables para ser empleada como FS en TFD. Pc9, además, demostró una potencia mucho mayor que otras Pcs evaluadas en ensayos preclínicos de TFD (Pucelik B. y col., 2016; Haywood-Small S.L. y col., 2006; Pereira P.M.R. y col., 2014b). Así, las investigaciones del grupo de Pucelik (Pucelik B. y col., 2016), centradas en el análisis de las propiedades fototóxicas de Pcs modificadas con flúor, permitieron concluir que la fluoración de cadenas alifáticas de las ftalocianinas aumentaba la potencia, si bien la IC_{50} se ubicó en el orden micromolar, tanto para líneas de carcinoma de colon como de carcinoma pulmonar. Por su parte, Haywood-Small y col. (2006) realizaron un estudio comparativo de la potencia de distintas Pcs con sustituyentes compuestos por cadenas aminoacídicas. Este grupo demostró que la citotoxicidad aumentaba cuanto más extenso era el sustituyente. Aún así, la mejor IC_{50} alcanzada fue de 171 μ M. A su vez, el grupo de Pereira (Pereira P.M.R. y col., 2014b) introdujo un enfoque nanotecnológico para la producción de FSs de tercera generación en forma de dendrímeros. Luego de desarrollar Pcs recubiertas por dieciséis unidades de galactosa, reportaron, en condiciones análogas a las empleadas en nuestros ensayos, un valor de IC_{50} de 2,1 μ M.

La naturaleza lipofílica de Pc9 la convierte en un compuesto interesante para ser incorporado en diferentes vehículos. Como se mencionó en la Introducción (sección 1.4), la administración de fármacos en *carriers* genera mejoras sustanciales en una serie de aspectos relevantes, como ser el aumento de la solubilidad de la droga, la posibilidad de administrarla por vía intravenosa, liberación controlada, tiempo de permanencia prolongado en circulación y capacidad de acumulación en tumores. En conjunto, estos factores nos impulsaron a evaluar el efecto de Pc9 vehiculizada en liposomas y micelas de poloxamina

Tetronic ® comerciales. Existen en la literatura numerosos reportes que muestran un incremento en la actividad fotodinámica de FSs al ser incorporados en diferentes tipos de vehículos. Así, por ejemplo, Richter A.M. y col. (1993) comprobaron un aumento de la potencia *in vivo* de un derivado de benzoporfirina en liposomas (Richter A.M. y col., 1993). Mientras que sin vehiculización se requirió una dosis de droga de 3,1 mg/kg para que el tumor desapareciera en el 50% de los animales, este valor se redujo a 1,9 mg/kg al utilizarse la formulación derivado-liposoma unilamelar. Una gran variedad de estudios de este tipo, que demuestran que la incorporación de FSs en *carriers* conduce a mejores efectos fototóxicos, han sido recopilados en un excelente trabajo de revisión realizado por Konan Y.N. y col. en el año 2002.

Con respecto a los liposomas utilizados en este trabajo (M1, M2, D1, D2, S y S-PEG), verificamos en primer lugar que ninguno de ellos fuera citotóxico por sí mismo, ya que esto implicaría una toxicidad sistémica que no permitiría el aprovechamiento de la TFD como una terapia selectiva para producir toxicidad sólo en el sitio de irradiación. Esta selectividad diferencia a la TFD de terapias convencionales, como la radio y quimioterapia, y la ubica como un campo en constante expansión (Sellera F.P. y col., 2016). Así, el crecimiento exponencial en las publicaciones relacionadas con la aplicación de TFD en oncología se pone en evidencia cuando se compara el número de publicaciones entre los años 2000 y 2015. Mientras que, en el primer caso, se registraron alrededor de 200 artículos, 15 años después el número ascendió a casi 650. En particular, es interesante resaltar el marcado crecimiento en el uso de nanopartículas en TFD (Manigat R. y col., 2012). En este sentido, los artículos que abordan esta temática comenzaron a aparecer a partir de 2003, para alcanzar alrededor de unas 50 publicaciones por año en el 2010.

Si bien al evaluar la citotoxicidad de los liposomas ninguno de estos presentó efectos sobre la viabilidad celular en concentraciones de hasta 50 µg/ml, cuando los mismos fueron “cargados” con Pc9, dos de las formulaciones (M1-Pc9 y M2-Pc9) evidenciaron un ligero efecto tóxico en la oscuridad. La diferencia en composición entre estos liposomas se detalla en Materiales y Métodos (Tabla 2.1). Básicamente, M1 y M2 están compuestos sólo o casi sólo por L-α-Fosfatidilcolina de yema de huevo Tipo XVI-E (PCEY) y L-α-Fosfatidiletanolamina de yema de huevo Tipo III (PEEY), mientras que los otros liposomas están compuestos por estos mismos lípidos y otros lípidos más (S y S-PEG) o bien por lípidos diferentes (D1 y D2). En consecuencia, la máxima concentración liposomal utilizada implicó una mayor cantidad de PCEY y PEEY en células incubadas con M1 y M2 en comparación con las células incubadas con los liposomas S y S-PEG. La toxicidad presentada por M1-Pc9 y M2-Pc9 podría ser entonces atribuida a una mayor concentración efectiva de PCEY y PEEY. De cualquier forma, esta característica de ser tóxicas en la

oscuridad, no ubica a las formulaciones Pc9-M1 y Pc9-M2 entre los mejores candidatos para ser utilizados en ensayos de TFD.

Cuando se evaluó la potencia fototóxica de Pc9 incorporada en los liposomas se pudo apreciar que existieron dos grupos. En el grupo de las combinaciones menos potentes se ubicaron M2-Pc9, D1-Pc9 y S-Pc9, con un valor de IC_{50} alrededor de 400 nM, mientras que en el de las combinaciones más potentes se ubicaron M1-Pc9, D2-Pc9 y S-PEG-Pc9, con valores de IC_{50} alrededor de 200 nM. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo descrito por otros autores que sostienen que la efectividad de ftalocianinas de zinc(II) en células tumorales depende de la composición del liposoma que las vehiculiza (García A.M. y col., 2011). No obstante, a pesar de esto, no fue posible encontrar una relación entre la potencia observada y las características fisicoquímicas de las formulaciones liposomales empleadas (López Zeballos N.C. y col., 2013). Una mayor potencia no se vio asociada a la eficiencia de incorporación de Pc9 al liposoma, ni a la generación de oxígeno singulete en solución, ni a la constante de asociación entre el FS y el vehículo. En cuanto a la composición de los liposomas, tampoco se observó una relación entre la presencia de algún componente lipídico y la mejora de la TFD, es decir, no se identificó ningún lípido que potencie el efecto del FS. El agregado de colesterol, incluso, produjo en un caso un aumento en la potencia (M1 *versus* M2), mientras que en otro caso (D1 *versus* D2) llevó a una disminución de la misma. Sí se notó, al contrastar los valores de IC_{50} de S-Pc9 y S-PEG-Pc9, que el agregado de polietilenglicol (PEG) a la 1,2-Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) repercutió en un aumento en la potencia. Esto, sin embargo, debería ser confirmado con un mayor número de experimentos en liposomas de variada composición. Más allá de su atractivo por disminuir el valor de IC_{50} , el uso de PEG resulta interesante considerando una proyección hacia la aplicación clínica, ya que la incorporación de estos polímeros en la superficie de los liposomas promueve la estabilización estérica, dando lugar a los denominados “liposomas *Stealth*”. Este tipo de vehículos resultan invisibles al sistema inmune y paredes vasculares, y además son menos propensos a formar conglomerados y ser captados por el hígado, por lo que su tiempo en circulación se encuentra aumentado, maximizándose así la probabilidad de alcanzar el tejido diana (Allen T.M. y col., 1995; Woodle M.C. y col., 1992). A su vez, la peguillación de ciertos *carriers* ha demostrado favorecer la acumulación del quimioterápico en el tumor (Wu N. y col., 1993).

Al comparar las potencias obtenidas en las formulaciones liposomales con la de Pc9 disuelta en DMSO-agua ($IC_{50} = 120$ nM), se observa que todos los valores de IC_{50} se encuentran en el mismo orden y, por ende, la vehiculización en liposomas no produciría una mejora sustancial. Aún así, cabe mencionar que el empleo de estos vehículos podría producir beneficios en la terapia no factibles de evidenciarse en un modelo de cultivo celular bidimensional. Dentro de los potenciales beneficios podemos nombrar una mejora en la

biodisponibilidad del FS, una reducción en la toxicidad o una capacidad aumentada para alcanzar el tejido tumoral.

Un FS ideal es aquel capaz de producir una eficiente generación de especies reactivas de oxígeno luego de ser irradiado. Estas especies citotóxicas median el daño que finalmente provoca la muerte celular (Dougherty T.J. y col., 1998; Henderson B.W. y Dougherty T.J., 1992; Sharman W.M. y col., 1999; Allison R.R. y col., 2010). Si bien contábamos con resultados que demostraban la capacidad de Pc9 de generar ROS en medios fluidos, esta propiedad debía aún ser comprobada en modelos celulares. En todos los casos, demostramos que los niveles de ROS se encontraron aumentados para una concentración de FS entre 2 y 5 veces mayor que el valor de IC₅₀, según la combinación liposoma-Pc9 empleada. Así, los niveles de ROS fueron mayores en las formulaciones más potentes, D2-Pc9 y S-PEG-Pc9, que mostraron la mayor relación concentración empleada / IC₅₀.

La corta vida media y distancia de difusión de las ROS (Sharman W.M., 2000) indican que ejercen su efecto en la zona circundante al sitio donde se generan. Por ende, aquellas organelas en las que se localice Pc9, previo a la irradiación, serán las organelas centrales en el desencadenamiento del proceso de muerte y determinarán el mecanismo de acción de la droga. En el caso de las dos combinaciones liposoma-Pc9 evaluadas por microscopía confocal, S-Pc9 y S-PEG-Pc9, la localización intracelular fue mayoritariamente lisosomal. Por lo tanto, la diferencia entre las potencias de S-Pc9 (400 ± 70 nM) y S-PEG-Pc9 (210 ± 120 nM) no puede ser explicada o atribuida a diferencias en la localización subcelular, por lo que otros factores deben ser considerados. Estos dos liposomas son idénticos en cuanto a qué lípidos los conforman y en qué proporción, salvo que S-PEG posee las moléculas de diestearoil fosfatidiletanolamina peguiladas. Más allá de las ventajas previamente mencionadas con respecto a la peguilación en sistemas *in vivo*, en este contexto podemos sugerir que el uso de PEG podría ser responsable de una incorporación diferencial de Pc9 a las células debida a la capacidad de esta molécula de disminuir la tendencia a la agregación de los liposomas. No obstante, resta aún evaluar si efectivamente la peguilación puede explicar las diferencias de potencia observadas entre S-Pc9 y S-PEG-Pc9.

Por otro lado, evaluamos la incorporación de Pc9 a micelas de poloxamina (T304, T904, T1107 y T1307). En primer lugar, demostramos que dos de ellas, T304 y T904 fueron citotóxicas en las células KB, a partir de concentraciones 0,10% y 0,02% P/V, respectivamente. Por el contrario, las micelas T1107 y T1307 no resultaron tóxicas hasta concentraciones 1% P/V. Estos resultados presentan similitudes con los reportados por otros grupos en cuanto a la citotoxicidad de las micelas T904, T1107 y T1307. Así, tanto en el trabajo de Cuestas M.L. y col. (2011) como en el de Alvarez-Lorenzo C. y col. (2010a) se demuestra la falta de toxicidad de las micelas T1107 y T1307 en líneas tumorales, como

Caco-2, Huh-7 y HepG-2, y un efecto tóxico de T904 a partir de una concentración 0,10% P/V. Por otro lado, puesto que en nuestro modelo de células KB las micelas T304 y T904 redujeron la viabilidad celular en ausencia de irradiación, estas fueron descartadas como posibles nanovehículos para Pc9.

Al incorporar Pc9 en las micelas T1107 y T1307, estas combinaciones no demostraron ser tóxicas en la oscuridad, pero al irradiarse generaron curvas dosis-respuesta con valores de IC_{50} de 10 ± 1 nM y $9,5 \pm 0,7$ nM, respectivamente, lo cual implicó una potencia 12 veces mayor a la obtenida para Pc9 disuelta en DMSO-agua. El uso de formulaciones micelares ha sido reportado por otros autores que evaluaron la eficacia en TFD de Pcs de silicio(IV) vehiculizadas en micelas poliméricas. Por ejemplo, el grupo de Master A.M. y col. (2010) demostró la fototoxicidad de una Pc de silicio(IV) vehiculizada en micelas, compuestas por bloques de polietilenglicol (PEG) y policaprolactona, en una línea de cáncer de mama. Por otro lado, Rijcken C.J.F. y col. (2007) se enfocaron en el estudio de la fototoxicidad sobre células de melanoma, y de carcinoma de cabeza y cuello, de otra Pc de silicio(IV) vehiculizada en una micela compuesta por bloques de ω -metoxi polietilenglicol-poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida-diacetato). A diferencia de lo observado en nuestros ensayos, el uso de estos carriers no permitió mejorar la potencia del FS, lo que realza el interés por las micelas de poloxamina como nanovehículos en TFD.

Para comprender las causas implicadas en los distintos valores de IC_{50} alcanzados para Pc9 según su formulación, se debe tener presente que las Pcs tienden a formar agregados con propiedades ópticas alteradas mediante asociación coplanar de monómeros. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio demostramos que Pc9 al vehiculizarse en estas micelas incrementa su potencia debido a que disminuye su tendencia a la agregación y aumenta su fotoestabilidad (Marino J. y col., 2013). De este modo, la mayor estabilidad asociada a una menor velocidad de degradación posibilita que cada molécula de FS atraviese un mayor número de ciclos de absorción de la luz irradiada y de emisión de energía. En consecuencia, aumenta la cantidad de reacciones Tipo I y Tipo II de las que es partícipe Pc9. En cuanto a la agregación, al buscar una asociación entre la disminución en la formación de agregados y las características fisicoquímicas de las micelas, se observó que T1107 y T1307 son los sistemas de mayor PM, tamaño y balance hidrofílico-lipofílico (BHL). Sobre la base de estos hallazgos, sería posible evaluar nuevos vehículos exacerbando estas cualidades para así intentar potenciar aún más el efecto de la TFD. Al mismo tiempo, estas estructuras son las que presentan una menor concentración micelar crítica (CMC), lo cual es particularmente favorable considerando el efecto de dilución que ocurriría al administrar en la clínica estas formulaciones Pc9-micela. En este sentido, las micelas de poloxamina Tetronic® presentan como ventaja adicional que, una vez formadas,

pueden persistir organizadas, aún cuando la concentración de polímero luego de su dilución pase a ser menor a la CMC (Chiappetta D.A. y Alejandro S., 2007; Kwon G.S., 2003).

Los resultados promisorios obtenidos en cultivos bidimensionales con Pc9-T1107 y Pc9-T1307, al no exhibir toxicidad en la oscuridad y presentar una gran potencia al ser irradiadas, postulan a estas formulaciones como interesantes para continuar realizando estudios. En particular, el uso de modelos *in vivo* es extremadamente útil al evaluar nuevas drogas, ya que pueden presentar grandes similitudes en respuesta a los tratamientos con respecto a lo que ocurre en humanos. Algunos ejemplos incluyen la respuesta inmune asociada, la farmacocinética, la farmacodinamia, es decir, características que en general son difíciles de determinar en modelos simplificados de cultivo celular. El estudio en modelos *in vivo* de Pc9 vehiculizada en micelas Tetronic® resulta particularmente auspicioso debido a algunas propiedades ya conocidas de estos *carriers*. Por ejemplo, una de estas propiedades es la prolongada capacidad de mantenerse en circulación y alcanzar el tejido diana, hecho que se atribuye a una inhibición en el reconocimiento por macrófagos probablemente debida a la hidrofiliidad de la corona micelar y al gran radio de curvatura (Kwon G., 1994).

Mediante ensayos de microscopía confocal y el empleo de sondas organelo-específicas demostramos que Pc9, al ser vehiculizada por la micela T1107, se ubica en lisosomas pero no en mitocondrias. Resultados similares han sido informados para otros FSs transportados por micelas poliméricas, que se han localizado preferencialmente en vesículas lisosomales. Algunos ejemplos que se pueden mencionar son el de una clorina incorporada en un *carrier* compuesto por poli(L-láctido)-polietilenglicol (Lee C.H. y col., 2015), y el de un diciano derivado de bacterioclorina quelado con zinc incorporado en micelas de polioxietilen glicerol triricinoleato (Huang Y. y col., 2012). Teniendo en cuenta que la localización subcelular de Pc9, vehiculizada tanto en micelas como en liposomas, fue lisosomal, se postula que las variaciones en la potencia no obedecen a la localización del FS dentro de la célula, sino más bien a otros factores. Uno de ellos podría ser la diferente cantidad de Pc9 que se incorpora a las células según el vehículo en el que es transportado el FS. Asimismo, es posible concluir que la localización de Pc9 fue independiente del vehículo utilizado.

Sobre la base de estos resultados, demostramos que Pc9 es un FS efectivo que presentó su máxima potencia al ser vehiculizado en micelas de poloxamina (T1107 y T1307), en comparación a su disolución en DMSO-agua o a su incorporación en liposomas. Además, Pc9 se localizó mayoritariamente en lisosomas y demostró capacidad de generar ROS en el entorno intracelular. A pesar de las similitudes en el efecto fototóxico de Pc9 vehiculizada en las micelas T1107 y T1307, decidimos continuar con el estudio del mecanismo de acción de la combinación Pc9-T1107 debido a la mayor fotoestabilidad del FS incorporado en este *carrier* (García Vior M.C. y col., 2013). Esta característica podría, en

una etapa posterior, maximizar la eficacia de la TFD en modelos experimentales más complejos, como son el modelo celular tridimensional y el modelo *in vivo*.

Capítulo 4

Mecanismo de acción de Pc9-T1107 en cultivos celulares bidimensionales

Una vez demostrada la eficacia fototóxica de la combinación Pc9-T1107 en la línea de células KB, decidimos continuar la evaluación de esta formulación en modelos de carcinoma de colon murino establecidos a partir de la línea celular CT26. La elección de esta línea para caracterizar el mecanismo de acción de Pc9-T1107 respondió a una serie de motivos. Por un lado, a nivel experimental, se reconoce la capacidad de estas células para formar cultivos tridimensionales, lo cual permite evaluar la terapia en estos modelos celulares más complejos que los cultivos bidimensionales (Bhave M.S. y col., 2015; Valcárcel M. y col., 2008). Además, el empleo de la línea CT26, obtenida por inducción tumoral en ratones Balb/c mediante agentes químicos (Brattain M.G. y col., 1980), hace posible el desarrollo de un modelo singénico *in vivo* basado en la inyección de las células en ratones inmunocompetentes. Adicionalmente, las mutaciones presentes en el ADN de las células CT26, así como el patrón de expresión génica, son similares a las que se producen en un carcinoma colorrectal (CCR) humano espontáneo, poco diferenciado, agresivo y refractario a terapias convencionales (Castle J.C. y col., 2014). En su conjunto, estas cualidades de las células CT26 permiten la evaluación de la TFD en una variedad de modelos celulares y animales, con similitudes a la patología descrita en humanos.

Cabe resaltar además que el CCR resulta muy relevante tanto a nivel global como local, siendo en el mundo el tercer tipo de tumor de mayor incidencia y el cuarto tipo de cáncer en cuanto a mortalidad (Hagggar F.A. y Boushey R.P., 2009; Kolligs F.T., 2016; Favoriti P. y col., 2016; Doleman B. y col., 2016; Aran V. y col., 2016). Según datos del Instituto Nacional del Cáncer de la Argentina, este tipo de tumor representa en nuestro país el segundo cáncer más frecuente así como el segundo que provoca mayor número de muertes (12% del total de defunciones por cáncer).

4.1. Efecto de la micela T1107 sobre la viabilidad de las células CT26.

Si bien en el capítulo anterior habíamos demostrado que la micela T1107 no resultaba citotóxica en concentraciones menores a 1% P/V, al seleccionar una nueva línea tumoral para continuar nuestros estudios se hizo necesario verificar que el nanovehículo T1107 fuera también inocuo en células CT26. Para ello se realizó un protocolo similar al descrito en la sección 3.1, incubando las células de carcinoma de colon murino durante 24 h con distintas concentraciones de T1107 e iluminando, o no, con una dosis de luz de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$ y longitud de onda mayor a 630 nm. Luego de 24 h de incubación, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de MTT.

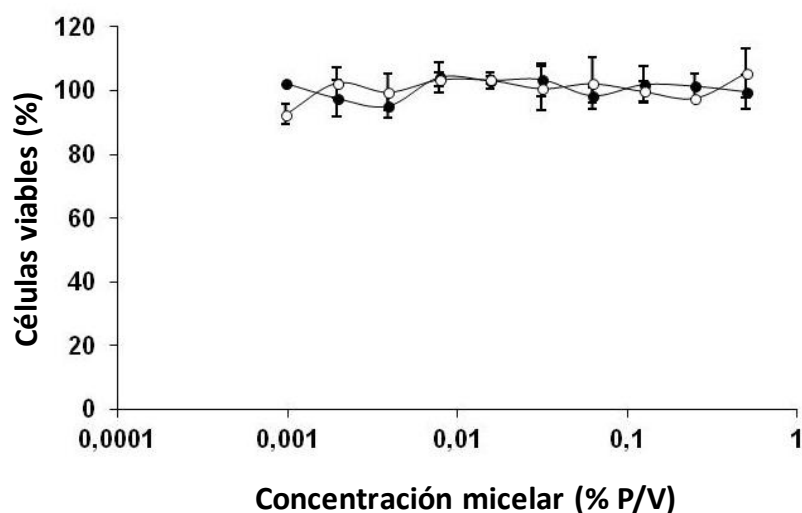


Figura 4.1. Efecto de diferentes concentraciones de la micela T1107 sobre la viabilidad de células CT26. Las células CT26 fueron incubadas durante 24 h con concentraciones variables de la micela T1107. 24 h después de la irradiación con una dosis de luz de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$ (○), la viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT. Como control, las células se analizaron también en la oscuridad (●). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

En la Figura 4.1 se muestra que la micela T1107 “vacía”, es decir, que no contiene FS, no resultó citotóxica en oscuridad en un rango de concentraciones entre 0,001 y 0,500% P/V. El mismo resultado fue obtenido cuando las células fueron irradiadas, lo cual indicó que T1107 es un *nanocarrier* apropiado para emplearse en esta línea celular.

4.2. Citotoxicidad de Pc9-T1107.

4.2.1. Citotoxicidad de Pc9-T1107 según su concentración.

A continuación, se realizaron curvas dosis-respuesta para evaluar la citotoxicidad y la potencia de Pc9-T1107 en la línea celular CT26. Para ello, se utilizaron soluciones 100 nM de Pc9, que corresponden a una concentración micelar de T1107 de 0,1% P/V.

Como se observa en la Figura 4.2, Pc9-T1107 no presentó efecto citotóxico en la oscuridad hasta concentraciones de 100 nM. En cambio, cuando las células fueron irradiadas se produjo una inhibición de la viabilidad dependiente de la concentración, que permitió definir un valor de IC_{50} de $10 \pm 2 \text{ nM}$, muy similar al obtenido previamente en células KB. Se observó, además, que la mínima concentración requerida para alcanzar el efecto máximo de muerte fue 20 nM.

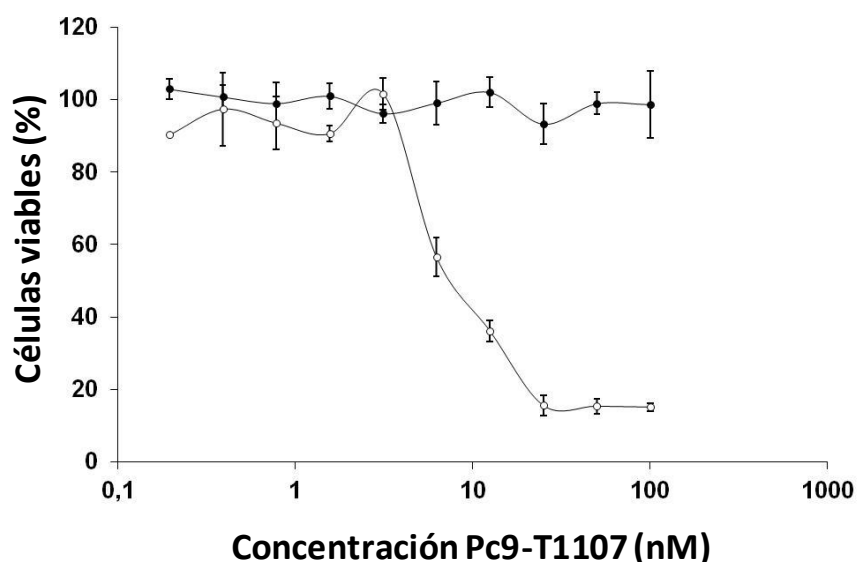


Figura 4.2. Efecto de diferentes concentraciones de Pc9-T1107 sobre la viabilidad de cultivos bidimensionales de células CT26. Las células fueron incubadas durante 24 h con diferentes concentraciones de Pc9-T1107. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT 24 h después de realizada la irradiación (○). Como control, las células se analizaron también en la oscuridad (●). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

La potencia citotóxica de la formulación Pc9-T1107 también se evaluó en diferentes líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano (SW480, HT-29 y Caco-2) a partir de curvas dosis-respuesta. Como se muestra en la Tabla 4.1, se obtuvieron valores de IC_{50} alrededor de 10 nM, similares a la potencia descrita en las células CT26. Teniendo en cuenta que no se obtuvieron evidencias de una marcada mejora en la potencia en las líneas humanas, reforzamos la idea de continuar nuestros estudios con la línea CT26, capaz de formar cultivos 3D y dar lugar a modelos singénicos.

Tabla 4.1. Concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) obtenidas para Pc9-T1107 en líneas celulares de carcinoma de colon.

Línea celular	IC_{50} (nM)
CT26	10 ± 2
Caco-2	11 ± 1
HT-29	6 ± 1
SW480	6 ± 1

4.2.2. Citotoxicidad de Pc9-T1107 según la energía lumínica.

Posteriormente, se decidió evaluar en la línea CT26 la dependencia entre viabilidad celular y energía de irradiación (o el tiempo de irradiación en nuestro caso, ya que la potencia de la lámpara se mantiene constante en $1,17 \text{ mW.cm}^{-2}$) para una concentración fija de Pc9-T1107 de 20 nM. La relación entre potencia, tiempo de irradiación y energía fue previamente comentada en Materiales y Métodos (sección 2.2.1.1).

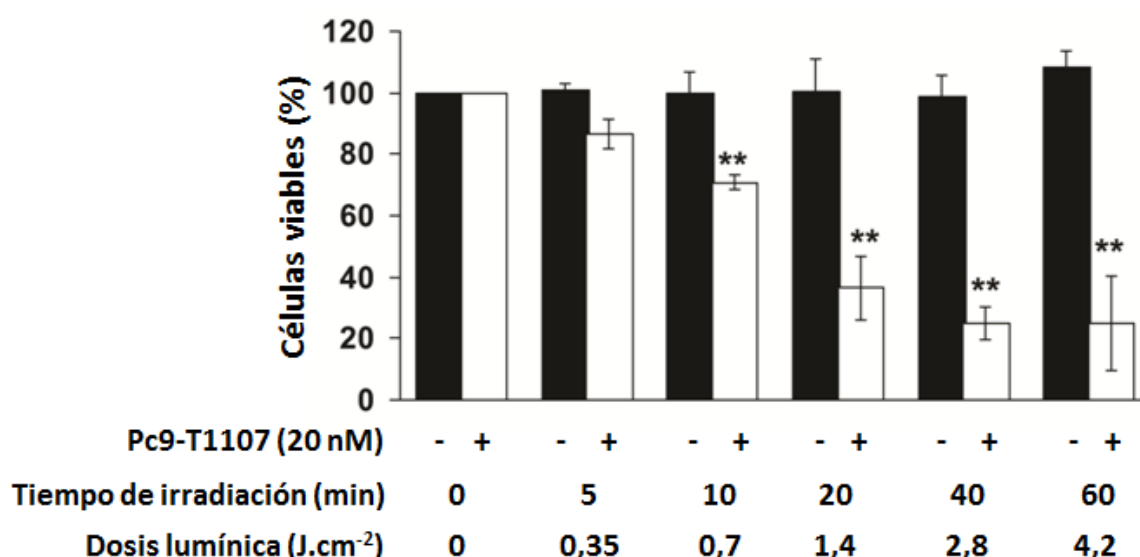


Figura 4.3. Efecto de distintas energías de irradiación sobre la acción citotóxica de Pc9-T1107. Las células CT26 fueron incubadas durante 24 h con soluciones 20 nM de Pc9-T1107. 24 h después de realizar irradiaciones de distinta energía, la viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT (barras blancas). Como control, las células se analizaron también sin previa incubación con Pc9-T1107 (barras negras). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. ** $p < 0,005$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107 y no irradiadas.

Como se muestra en la Figura 4.3, la iluminación de células no incubadas con Pc9-T1107 no disminuyó la proporción de células viables para dosis lumínicas de hasta $4,2 \text{ J.cm}^{-2}$. Sin embargo, luego de la incorporación de Pc9-T1107, la irradiación con una energía de al menos $0,70 \text{ J.cm}^{-2}$ fue suficiente para lograr una reducción significativa en la viabilidad celular. Este efecto fue aún mayor al aumentar la energía de irradiación, alcanzando un nivel máximo con 40 min de iluminación. El aumento en el tiempo de irradiación a 60 min, y por ende de la energía con la que se irradiaron las células, no logró acrecentar el número de células no viables. Se concluyó, entonces, que para una concentración 20 nM de Pc9-

T1107, la mínima cantidad de energía necesaria para lograr la máxima disminución en la viabilidad celular fue de 2,8 J.cm⁻².

4.2.3. Citotoxicidad de Pc9-T1107 a diferentes tiempos post-irradiación.

Resultó también de interés evaluar el tiempo requerido para observar el efecto de Pc9-T1107 sobre la viabilidad celular. Para ello, se realizó el revelado con MTT a distintos tiempos post-irradiación.

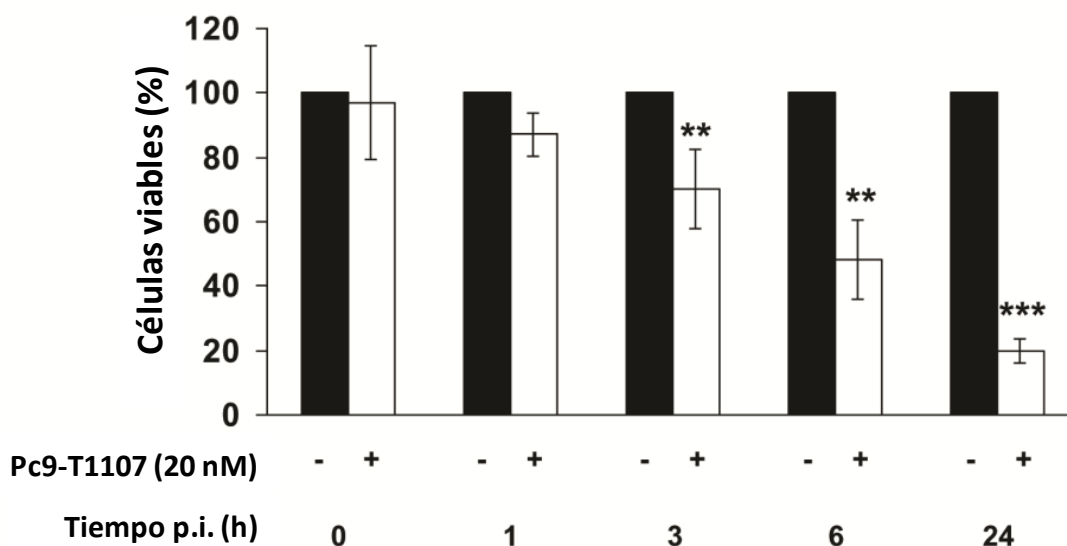


Figura 4.4. Relación entre el tiempo post-irradiación y la viabilidad celular luego de una dosis de TFD con 20 nM de Pc9-T1107. Las células CT26 fueron incubadas durante 24 h con soluciones 20 nM de Pc9-T1107. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT a distintos tiempos post-irradiación (barras blancas). Como control, las células se analizaron también sin previa incubación con Pc9-T1107 (barras negras). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Test t de Student. **p<0,005, ***p<0,0001, significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

En la Figura 4.4 se muestra que el mínimo tiempo necesario para que una concentración 20 nM de Pc9-T1107 genere una disminución significativa en la viabilidad celular fue de 3 h. La viabilidad celular fue alrededor de un 50% a las 6 h p.i., mientras que se requirieron 24 h de incubación post-irradiación para alcanzar el efecto máximo de la TFD.

4.3. Captación y liberación celular de Pc9-T1107.

Puesto que Pc9 es una molécula fluorescente, esta característica resultó de suma utilidad para realizar diversos tipos de determinaciones en una variedad de equipos. Así como esta propiedad del FS se utilizó previamente para obtener imágenes de microscopía

confocal, en este caso nos enfocamos en evaluar los procesos de captación y liberación de Pc9 en células CT26 mediante el uso de un citómetro de flujo y de un fluorómetro.

4.3.1. Captación celular de Pc9-T1107 en función del tiempo de incubación.

En primer lugar, estudiamos la relación entre la captación de Pc9 en células CT26 y el tiempo de incubación. Para ello, las células CT26 fueron incubadas durante distintos tiempos con una concentración 20 nM de Pc9-T1107 en la oscuridad, es decir, no se utilizó irradiación en este tipo de experimento. Finalmente, los niveles de Pc9 presentes en las células fueron evaluados mediante un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus al excitar con luz de 640 nm y medir la emisión de Pc9 en 675 nm.

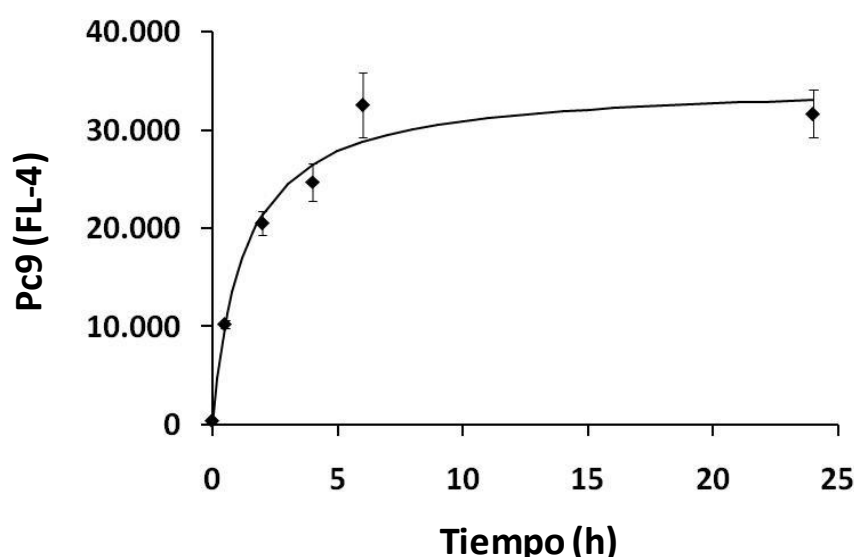


Figura 4.5. Captación de Pc9 por células CT26 en función del tiempo. Las células fueron incubadas en la oscuridad con soluciones 20 nM de Pc9-T1107 durante distintos tiempos. Luego, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en buffer PBS. La captación fue estimada a partir de la fluorescencia de Pc9 cuantificada con un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

La Figura 4.5 muestra que luego de 30 min de incubación los niveles intracelulares de Pc9 se encuentran significativamente aumentados. La cantidad de Pc9 incorporada siguió aumentando en función del tiempo de incubación hasta alcanzar un máximo a las 6 h, momento en el cual la curva tiende a un *plateau*. En consecuencia, después de 24 h de incubación, la fluorescencia intracelular de Pc9 resultó similar a la detectada a las 6 h. Por una cuestión de practicidad experimental, el tiempo de incubación utilizado en los ensayos subsiguientes para alcanzar el máximo ingreso del FS fue de 24 h.

4.3.2. Captación celular de Pc9-T1107 según la concentración del fotosensibilizador.

Posteriormente se procedió a evaluar la relación entre la captación del FS y la concentración de Pc9-T1107 con la que se incubaron los cultivos de células CT26. Para ello, las células fueron incubadas durante 24 h con distintas concentraciones de Pc9-T1107 y analizadas por citometría de flujo en forma similar a lo descrito en la sección 4.3.1.

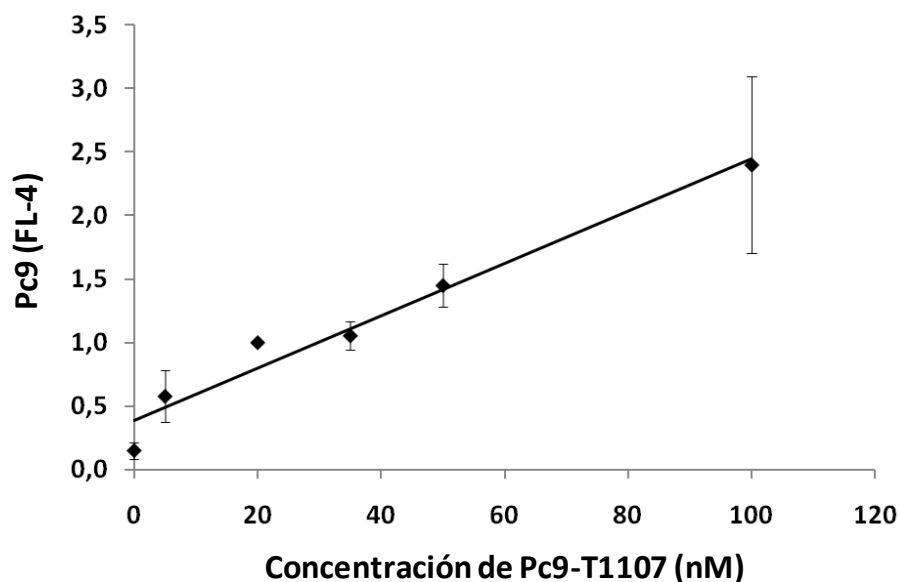


Figura 4.6. Captación de Pc9 por células CT26 en función de la concentración de Pc9-T1107. Las células fueron expuestas en la oscuridad a soluciones de distinta concentración de Pc9-T1107. Luego de 24 h de incubación, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en buffer PBS. La captación fue estimada a partir de la fluorescencia de Pc9 cuantificada con un citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 4.6, hay una relación directamente proporcional entre la cantidad de FS incorporado a las células y la concentración presente en el medio de incubación, siendo el proceso de captación no saturable en un rango de concentraciones entre 0 y 100 nM de Pc9-T1107.

4.3.3. Liberación de Pc9-T1107 en función del tiempo de incubación.

Por último, se estudió la cinética de liberación de Pc9 de las células CT26. Los cultivos de células CT26 fueron incubados durante 24 h con una concentración 200 nM de Pc9-T1107 para alcanzar una captación máxima del FS, según lo observado en la Figura 4.5. Luego, el medio de cultivo conteniendo Pc9-T1107 fue reemplazado por medio de cultivo sin

FS, y después de distintos tiempos de incubación las células fueron tripsinizadas y lisadas. La fluorescencia de Pc9 en el lisado celular fue cuantificada utilizando un fluorómetro.

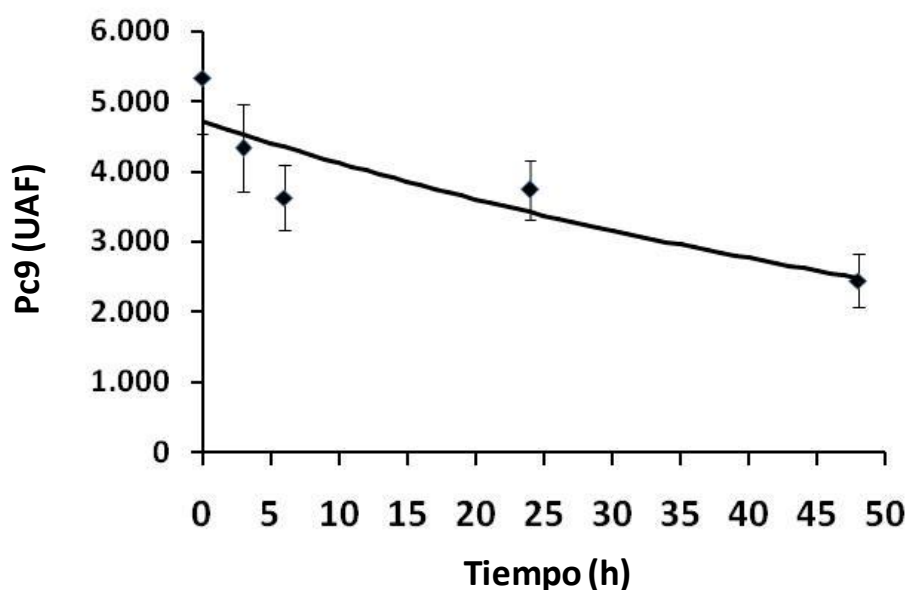


Figura 4.7. Liberación de Pc9 de células CT26 en función del tiempo. Las células CT26 fueron expuestas en la oscuridad a una solución 200 nM de Pc9-T1107. Luego de 24 h, el medio de cultivo conteniendo Pc9-T1107 fue reemplazado por medio de cultivo sin FS. Tras distintos tiempos de incubación, las células fueron tripsinizadas y lisadas. La cantidad de Pc9 remanente en las células fue cuantificada midiendo la emisión entre 695 y 750 nm por medio de un espectrofluorómetro Jasco FP-6500. Los resultados fueron expresados como la media de la señal de fluorescencia \pm ES de al menos tres experimentos independientes. UAF representa unidades arbitrarias de fluorescencia.

Como se observa en la Figura 4.7, los niveles de Pc9 en las células no se encontraron disminuidos luego de 3 h de incubación en medio de cultivo sin FS, pero sí a partir de las 6 h. La cantidad de Pc9 continuó decreciendo en función del tiempo hasta alcanzar a las 48 h valores cercanos al 50% del valor inicial.

4.4. Niveles de ROS y muerte celular.

4.4.1. Generación de ROS.

Puesto que en un trabajo previo se demostró que la formulación Pc9-T1107 era capaz de generar oxígeno singlete en solución al estar disuelta en tetrahidrofurano o DMSO-agua 2% V/V (García Vior M.C. y col., 2013), decidimos evaluar la relevancia de las especies reactivas de oxígeno en el proceso de muerte de las células CT26. Como se explicó en la Introducción (sección 1.2.1), el rol central de estas moléculas en TFD se encuentra ampliamente descripto. Las ROS poseen la capacidad de oxidar distintas macromoléculas biológicas alterando su normal funcionamiento (Dougherty T.J. y col., 1998; Henderson

B.W. y Dougherty T.J., 1992; Sharman W.M. y col., 1999; Allison R.R. y col., 2010). Con este objetivo se utilizó la sonda 2',7'-Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), que en presencia de ROS genera la especie fluorescente diclorofluoresceína (DCF). Los niveles de DCF fueron monitoreados utilizando un fluorómetro de placa, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

En la Figura 4.8A se puede apreciar, a partir de las mediciones realizadas en un fluorómetro de placa, que a mayores concentraciones de Pc9-T1107 aumentan los niveles de ROS generados. Así, el incremento de ROS fue evidente a una concentración 10 nM (aquella en la que se obtiene un 50% de células no viables), y alcanzó mayores valores en función de la concentración hasta la máxima condición ensayada (50 nM). En cambio, para las concentraciones 2 y 5 nM no existió diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Como se observó en la Figura 4.2, estas concentraciones 5 y 2 veces menores a la IC₅₀, respectivamente, no tienen un efecto citotóxico marcado. Análogamente, mediante microscopía de fluorescencia (Figura 4.8B) se obtuvo un incremento en los niveles de ROS para las concentraciones 10 y 20 nM, respecto a los controles que no mostraron emisión verde proveniente de DCF. Esta emisión de fluorescencia corresponde a la generación de DCF a partir de DCFH-DA provocada por ROS. Por último, cuando los niveles de ROS obtenidos luego del tratamiento con Pc9-T1107 se cuantificaron por citometría de flujo (Figura 4.8C), se demostró que para concentraciones 2 y 5 veces mayores a la IC₅₀ existió un aumento significativo en los niveles de estas especies.

4.4.2. Efecto de antioxidantes sobre la viabilidad celular.

El aumento en los niveles de ROS luego de la irradiación de células conteniendo Pc9-T1107, junto a su capacidad de generar un daño oxidativo, nos llevó a investigar la participación de estas especies en el proceso de muerte celular (Marino J. y col., 2013; Yoo J. y col., 2011). Para ello, procedimos a evaluar la toxicidad celular de Pc9-T1107 pre-incubando las células con distintas concentraciones de los antioxidantes TROLOX y N-

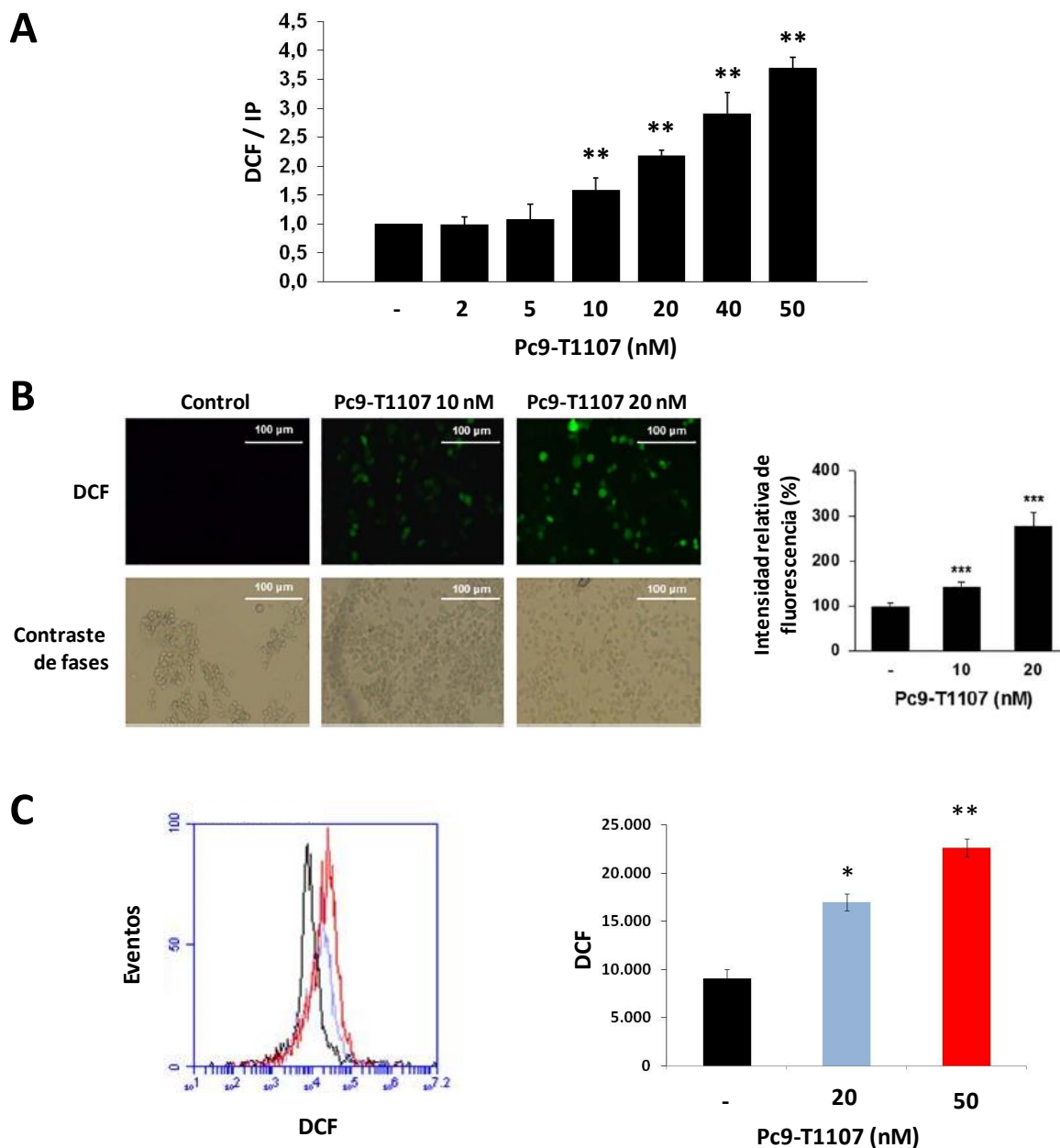


Figura 4.8. Efecto de Pc9-T1107 sobre la generación de ROS en células CT26. (A) Las células CT26 (60.000/pocillo) expuestas durante 24 h a distintas concentraciones de Pc9-T1107 fueron luego incubadas a 37°C durante 30 min con una solución 10 mM de DCFH-DA. Tras remover la sonda e irradiar, las células fueron solubilizadas y la fluorescencia de DCF fue cuantificada utilizando un fluorómetro. El contenido de ADN fue estimado después de la incubación en la oscuridad con una solución 50 μ M de yoduro de propidio. Los resultados se expresan como el cociente entre la señal correspondiente a DCF y la señal correspondiente a IP. (B) Alternativamente, la formación de ROS fue detectada en células CT26 crecidas sobre cubreobjetos mediante microscopía de fluorescencia (panel izquierdo superior). La morfología celular fue examinada mediante microscopía de contraste de fases (panel izquierdo inferior), mientras que la intensidad de fluorescencia fue determinada con el software ImageJ (panel derecho). Barra de referencia: 100 μ m. (C) Histogramas obtenidos a partir de la medición de los niveles de ROS mediante citometría de flujo (panel izquierdo). Cuantificación de

los niveles de ROS a partir de la mediana correspondiente a cada histograma (panel derecho). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

acetil-L-cisteína (NAC) 1 h antes de la irradiación. La viabilidad celular fue determinada 24 h post-irradiación.

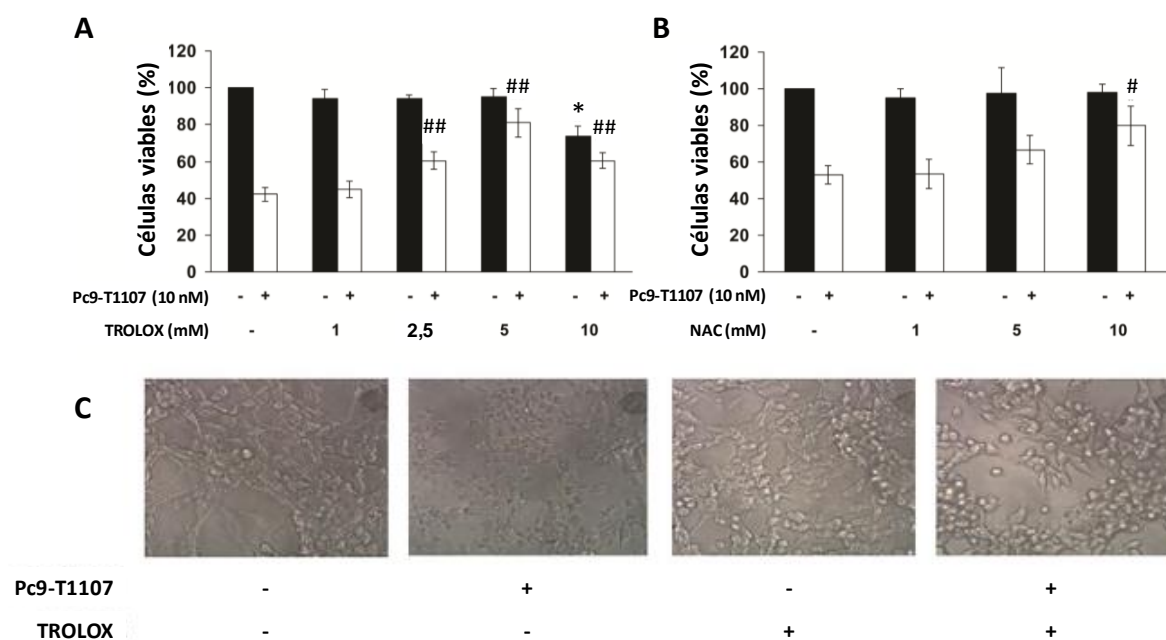


Figura 4.9. Efecto de antioxidantes sobre la muerte celular provocada por Pc9-T1107. Luego del tratamiento fotodinámico con una concentración 10 nM de Pc9-T1107, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de la Hexosaminidasa en células pre-incubadas con TROLOX (A) o NAC (B). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,0001$ células incubadas sólo con inhibidor significativamente distintas de células incubadas en su ausencia. # $p < 0,05$, ## $p < 0,005$ células sometidas a TFD significativamente distintas de células tratadas con Pc9-T1107 en ausencia de inhibidor. (C) Morfología de células CT26 cargadas o no con Pc9-T1107 e incubadas con o sin una solución 5 mM de TROLOX. Aumento: 200X.

La Figura 4.9 representa la viabilidad celular obtenida luego de la TFD, previa incubación con antioxidantes. Las barras negras, correspondientes a células incubadas en ausencia de Pc9-T1107, muestran si el inhibidor es tóxico *per se*. En cambio, las barras blancas representan las condiciones en las que células conteniendo Pc9-T1107 fueron pre-incubadas con los antioxidantes correspondientes y después iluminadas. Como se observa en la Figura 4.9A, una concentración 10 mM de TROLOX resultó tóxica para las células, no así las concentraciones menores ensayadas. Al interpretar los resultados correspondientes

a las barras blancas, se evidenció que una concentración de 2,5 mM de TROLOX podía prevenir parcialmente el daño citotóxico producido por Pc9-T1107, mientras que con una concentración 5 mM la inhibición de la TFD fue casi total. En cuanto a la NAC (Figura 4.9B), la muerte celular producida por Pc9-T1107 logró evitarse casi por completo sólo a una concentración 10 mM. La acción protectora de TROLOX se puso en evidencia también mediante fotografías de campo claro (Figura 4.9C), en las cuales se observa una morfología similar de las células incubadas con TROLOX con respecto a las células control (sin TROLOX y sin Pc9-T1107), mientras que después del tratamiento fotodinámico de células pre-incubadas con Pc9-T1107, en presencia del antioxidante, se logró evitar no solo una disminución en el número de células sino también ciertas alteraciones morfológicas de las mismas, como ser pérdida del aspecto fusiforme.

4.5. Localización subcelular de Pc9.

Con el propósito de conocer los sitios en los que se inicia el daño fototóxico producido por Pc9-T1107, decidimos evaluar cuál era la localización subcelular del FS una vez incorporado dentro de las células. Esta información resulta importante para identificar qué organelas serán blanco del daño oxidativo, y por ende, cómo será el mecanismo de muerte producido por Pc9-T1107. Para ello, como se especificó en la sección 2.2.1.4, se utilizó la técnica de microscopía confocal con sondas organelo-específicas para núcleos (Höchst 33258), lisosomas (LysoTracker Green DND-26), mitocondrias (MitoTracker Green FM) y retículo endoplásmico (ER-Tracker Blue-White DPX).

Como se muestra en la Figura 4.10, al no existir superposición entre la señal roja propia del Pc9 y la señal azul característica de la sonda nuclear Höchst 33258, se concluyó que Pc9 no se ubicaba en los núcleos celulares sino en el citosol. Posteriormente, decidimos investigar en qué organelas citoplasmáticas se localizaba Pc9.

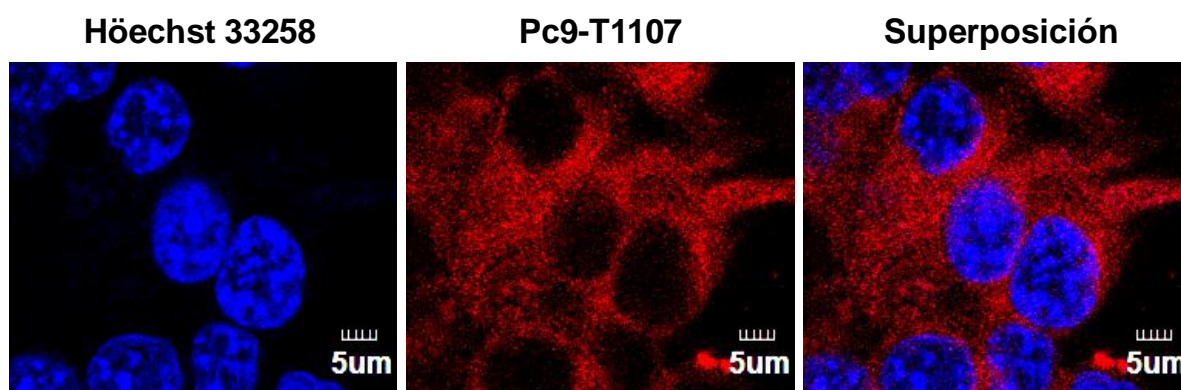


Figura 4.10. Evaluación de la localización nuclear de Pc9. Células CT26 fueron crecidas sobre cubreobjetos e incubadas durante 24 h en oscuridad con soluciones 100 nM de Pc9-T1107. Los núcleos se tiñeron con Höchst 33258 (2 µg/ml) y fueron visualizados mediante microscopía

confocal. En la fotografía de la derecha se presenta la imagen de superposición obtenida a partir de la emisión de Hoechst 33258 y la emisión de Pc9. Barra de referencia: 5 μ m.

En las fotografías presentadas en la Figura 4.11 se puede observar que Pc9 se localizó principalmente en lisosomas y retículo endoplásmico. En el caso de las organelas ácidas, la señal verde de la sonda LysoTracker Green se superpuso con la señal roja propia de Pc9, generando el patrón amarillo que se observa en la imagen de la tercera columna. Por su parte, la señal violeta apreciada en la superposición para retículo endoplásmico se debió a la colocación de la emisión azul propia de la sonda ER-Tracker Blue-White DPX y la emisión roja de Pc9. Con respecto a las mitocondrias, se concluyó que Pc9 no estuvo presente en estas organelas ya que al superponer ambas fotografías no se detectaron áreas amarillas, sino la señal roja de Pc9 por un lado y la señal verde de MitoTracker Green por otro.

4.6. Permeabilización de las membranas lisosomales.

Una vez demostrada la localización de Pc9 en los lisosomas, resultó posible hipotetizar que la generación de ROS en estas organelas conllevaba al daño oxidativo de sus membranas con la consiguiente liberación del contenido lisosomal al citosol. Este proceso contribuiría sin duda alguna al mecanismo de fototoxicidad. Los lisosomas son organelas acídicas que han demostrado tener un rol importante en diversos procesos de muerte celular (Repnik U. y col., 2012; Johansson A.C. y col., 2010; Boya P. y Kroemer G., 2008). Esto se debe a la participación de proteasas específicas lisosomales que son liberadas al citoplasma luego de la permeabilización de la membrana de esta organela. Las técnicas empleadas en esta sección con el fin de determinar el estado de las membranas lisosomales luego de la TFD con Pc9-T1107, consistieron en la tinción de los lisosomas con naranja de acridina y la cuantificación de los niveles citoplasmáticos de Cathepsina D y los totales de Hsp70.

4.6.1. Tinción con naranja de acridina.

Con el fin de evaluar la posible permeabilización de la membrana lisosomal decidimos, en primer lugar, incubar células CT26 con la sonda naranja de acridina. Esta sonda fluorescente al localizarse en lisosomas se ve afectada por el pH ácido de los mismos y por

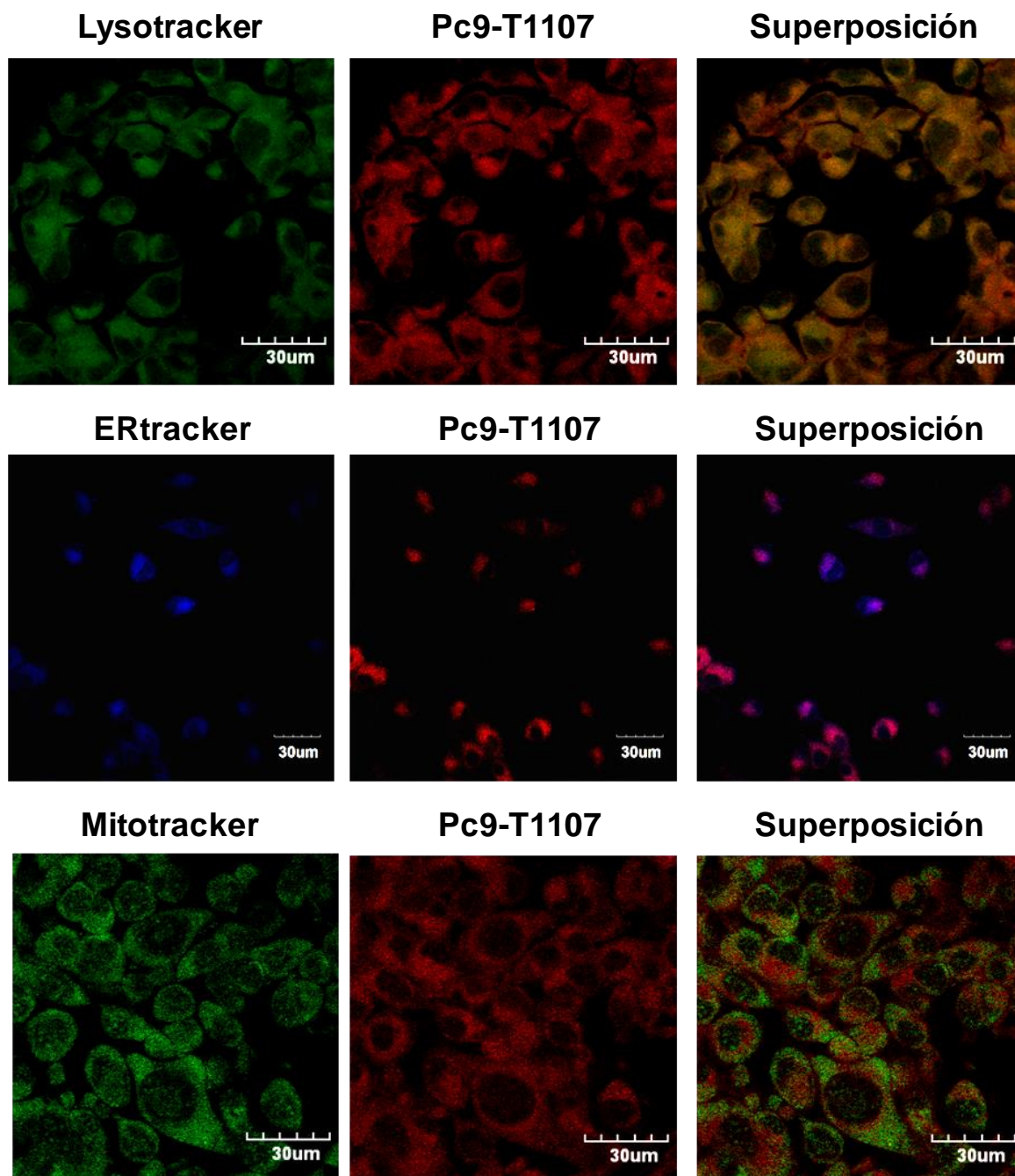


Figura 4.11. Localización intracelular de Pc9 en células CT26. Las células fueron expuestas durante 24 h a soluciones 100 nM de Pc9-T1107 y luego incubadas con LysoTracker Green DND-26 (75 nM, 30 min), ER-Tracker Blue-White DPX (400 nM, 30 min) o MitoTracker Green FM (100 nM, 45 min). La emisión roja corresponde a Pc9-T1107, la verde a la señal de lisosomas o mitocondrias y la azul a la emisión desde el RE. Barra de referencia: 30 µm.

ende presenta emisión de luz naranja. Por otro lado, en compartimentos de mayor pH puede unirse a moléculas de ADN y generar fluorescencia verde. La señal generada por esta sonda fue determinada mediante microscopía de fluorescencia.

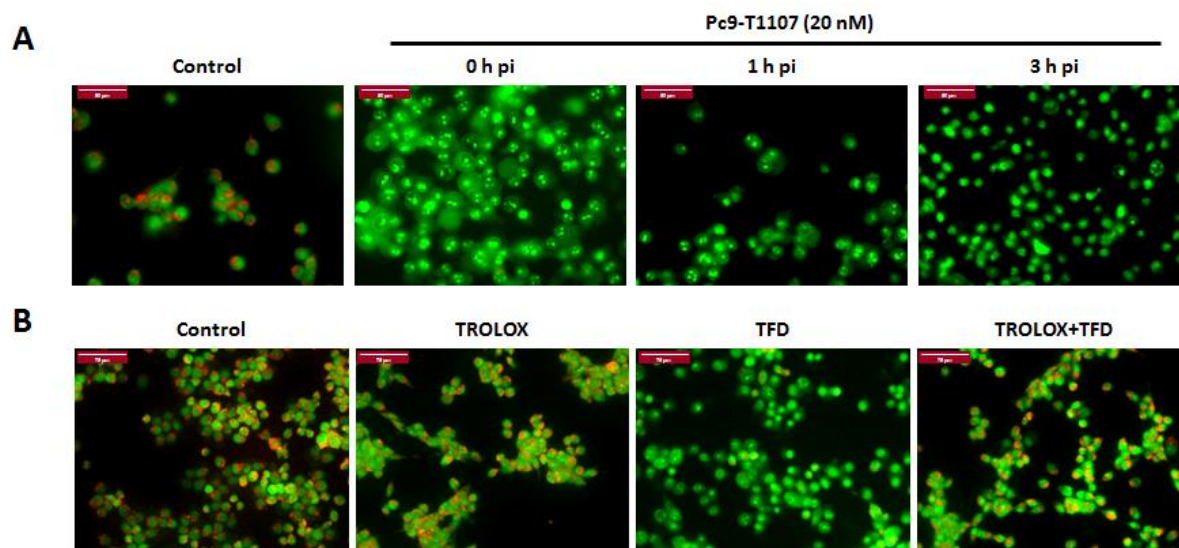


Figura 4.12. Determinación de la fluorescencia de naranja de acridina. Células CT26 crecidas sobre cubreobjetos, incubadas o no con una concentración 20 nM de Pc9-T1107, fueron irradiadas en ausencia (A) o presencia (B) de una solución 5 mM de TROLOX. Tras la irradiación, los lisosomas fueron marcados con naranja de acridina (5 μM) y examinados mediante microscopía de fluorescencia a distintos tiempos post-irradiación (A) o a 1 h p.i. (B). Aumento: 600X (A) y 400X (B). Barra de escala: 50 μm (A) y 75 μm (B).

Al analizar las fotografías presentadas en la Figura 4.12A, se observa en las células control la emisión de fluorescencia naranja proveniente de los lisosomas. Sin embargo, la emisión de luz naranja no fue evidente luego de irradiar células pre-incubadas con una concentración 20 nM de Pc9-T1107. Esta alteración a nivel lisosomal se hizo evidente apenas finalizada la iluminación (tiempo 0 post-irradiación) y se mantuvo hasta las 3 h p.i. Estos resultados sugirieron que la integridad de las membranas lisosomales se vio afectada por la TFD, perdiéndose el pH ácido característico de esta organela y por ende la capacidad de la sonda de emitir luz naranja.

Anteriormente, se mostró que la inhibición de ROS podía prevenir casi en su totalidad el proceso de muerte desencadenado por Pc9-T1107 (Figura 4.9). Sobre la base de este resultado, decidimos evaluar si las ROS generadas luego de la TFD con Pc9-T1107 estaban involucradas en la permeabilización de la membrana lisosomal. Como se muestra en la Figura 4.12B, la pre-incubación de células CT26 con el antioxidante TROLOX no modificó el patrón de fluorescencia con respecto a células control, ya que en ambos casos se observaron organelas naranjas correspondientes a lisosomas de pH ácido. En forma análoga, cuando las células fueron pre-incubadas con TROLOX (5 mM) previo a la TFD, se observó mayor número de células con lisosomas intactos con respecto a las células sometidas a la TFD en ausencia de inhibidor. Esto indicó que el daño a los lisosomas se vio

atenuado gracias al uso del antioxidante y que, por ende, las ROS se encuentran involucradas en el proceso de permeabilización de la membrana lisosomal.

4.6.2. Niveles citoplasmáticos de Catepsina D.

Los lisosomas contienen una gran variedad de proteínas implicadas en procesos fisiológicos de degradación de bio-macromoléculas. Algunas de estas proteasas lisosomales pertenecen a la familia de las Catepsinas y son específicas de esta organela. La presencia de alguna de estas proteínas en citosol es indicativa, por ende, de permeabilización de la membrana lisosomal. Por ello, decidimos determinar los niveles de Catepsina D, una proteasa específica de lisosoma, en fracciones citosólicas provenientes de células CT26 mediante ensayos de WB.

Como se muestra en la Figura 4.13, las células que fueron pre-incubadas con Pc9-T1107 y posteriormente iluminadas presentaron mayores cantidades de Catepsina D en su citosol luego de 1 h y 3 h post-irradiación. Los niveles de esta proteasa en la fracción citosólica fueron aproximadamente 2,5 veces mayores para células tratadas con respecto a células control.

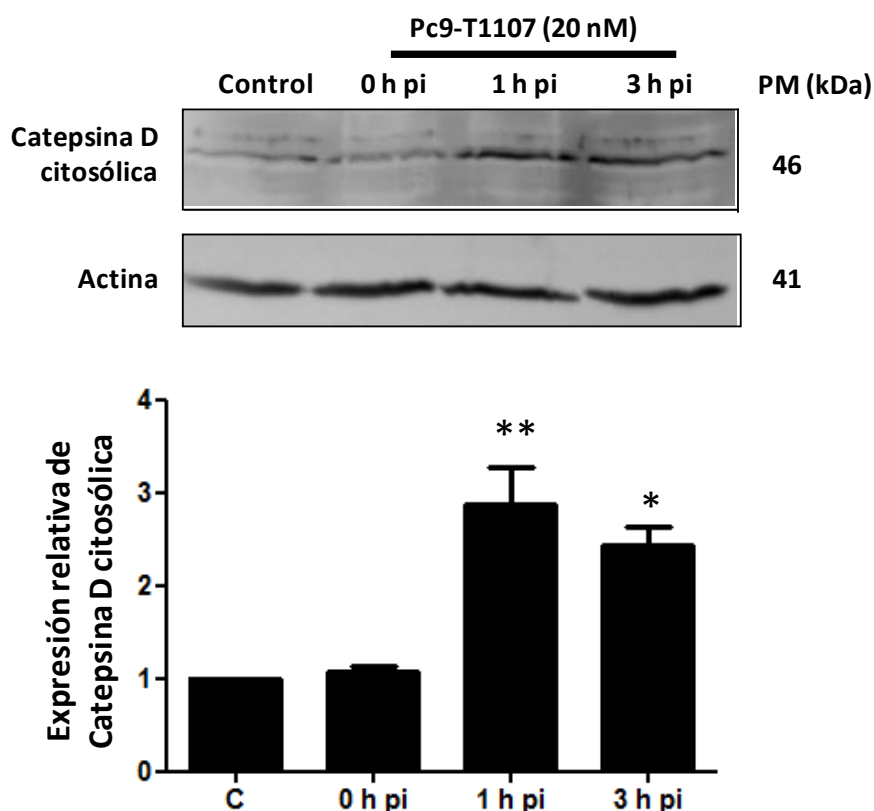


Figura 4.13. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles citosólicos de la proteasa lisosomal Catepsina D. Células CT26 expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas e

incubadas durante distintos tiempos. Luego de lisar mecánicamente las células, se procedió a centrifugar para obtener fracciones citosólicas que fueron a continuación sometidas a WB utilizando un anticuerpo específico para Cathepsina D. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas correspondientes al menos a tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

4.6.3. Niveles de Hsp70.

Diversas macromoléculas intervienen en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana lisosomal, entre las que se puede incluir a la chaperona *Heat Shock Protein 70* (Hsp70) (Nylandsted J. y col., 2004; Doulias P.T. y col., 2007; Petersen N.H. y col., 2010). Esta proteína participa en el mantenimiento de la integridad de la membrana lisosomal al promover el aumento en los niveles de ceramida, una molécula que posee la capacidad de estabilizar membranas lipídicas de forma más eficiente que el colesterol (Yamashima T., 2016; Petersen N.H. y Kirkegaard T., 2010).

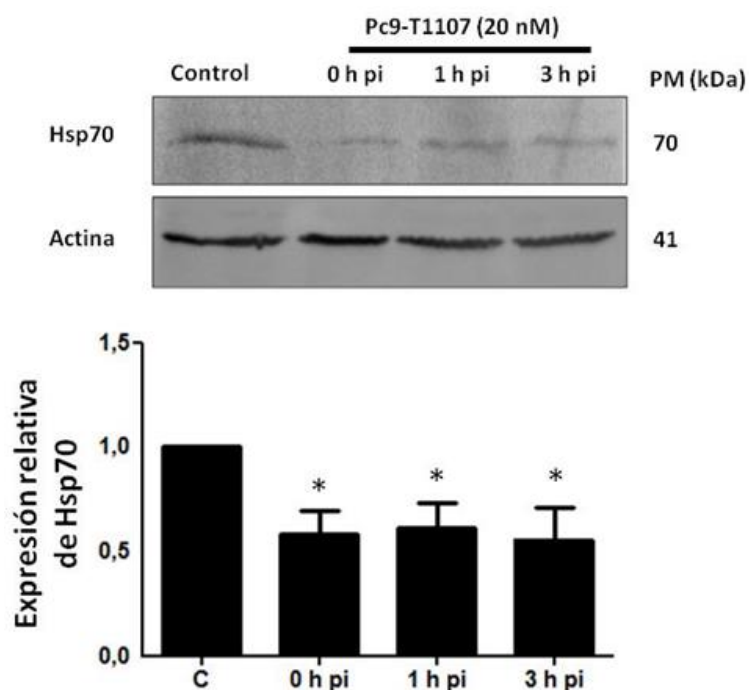


Figura 4.14. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles de Hsp70. Células CT26 expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas e incubadas durante distintos tiempos. Luego de lisar las células, se procedió a centrifugar para obtener lisados totales que fueron analizados por WB utilizando un anticuerpo específico para Hsp70. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas correspondientes al menos a tres experimentos independientes. Los resultados están expresados

como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se muestra en la Figura 4.14 en un WB representativo para lisado total celular, se apreció una disminución en los niveles de Hsp70 inmediatamente luego de la irradiación. La cuantificación realizada a través de la densitometría evidenció una reducción del 50% en la cantidad de esta proteína tanto a las 0 como 1 y 3 h p.i.

En su conjunto, tanto la ausencia de emisión del naranja de acridina proveniente de lisosomas, como el aumento de Catepsina D en la fracción citosólica y la disminución de los niveles de Hsp70, permitieron concluir que la TFD en células CT26 con la formulación Pc9-T1107 indujo la permeabilización de las membranas lisosomales con la consecuente liberación de proteasas lisosomales al citosol.

4.7. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la acción fototóxica de Pc9-T1107.

Sobre la base de los resultados anteriores, decidimos evaluar posteriormente el rol que desempeñaban distintas proteasas en el proceso de muerte. Para ello, en ensayos de viabilidad celular, se utilizaron los siguientes inhibidores proteicos: Pepstatina A, que ejerce su efecto sobre la proteasa lisosomal Catepsina D (Johansson A.C. y col., 2003; Heinrich M. y col., 2004; Liaudet-Coopman E. y col., 2006), CA-074 Me, un inhibidor específico de Catepsina B (Cho K. y col., 2013; Victor B.C. y col., 2011), y aprotinina, que posee la capacidad de inhibir serin-proteasas (Dobkowski W.B. y col., 1998; Peters D.C. y Noble S., 1999).

Como se puede observar en la Figura 4.15, ninguna de las concentraciones empleadas de Pepstatina A, CA-074 Me ni aprotinina resultaron tóxicas, ya que el porcentaje de viabilidad celular obtenido al incubar las células CT26 con cada uno de los inhibidores (en ausencia de Pc9-T1107) fue similar al control sin inhibidor.

En el caso de Pepstatina A, el efecto fototóxico de Pc9-T1107 fue menor en presencia de una concentración 80 μ M (Figura 4.15A). Así, mientras que en ausencia de Pepstatina A la viabilidad celular luego de la TFD fue del 38%, la pre-incubación con una concentración 80 μ M del inhibidor subió este valor a un 75%.

En presencia de CA-074 Me, inhibidor específico de Catepsina B, sólo utilizando una concentración 1,0 μ M se observó disminución del daño fototóxico producido por la TFD (Figura 4.15B).

Asimismo, como se observa en la Figura 4.15C, la capacidad de aprotinina para evitar el proceso de muerte celular se hizo evidente con concentraciones de 300 y 600 nM. La viabilidad celular en estas condiciones fue de 83% con respecto a células control, mientras que sin la pre-incubación con el inhibidor de serin-proteasas este parámetro fue 53%.

En su conjunto, estos resultados confirman la participación de, al menos, estas proteasas en el proceso de muerte de células CT26 sometidas a terapia fotodinámica con la formulación Pc9-T1107.

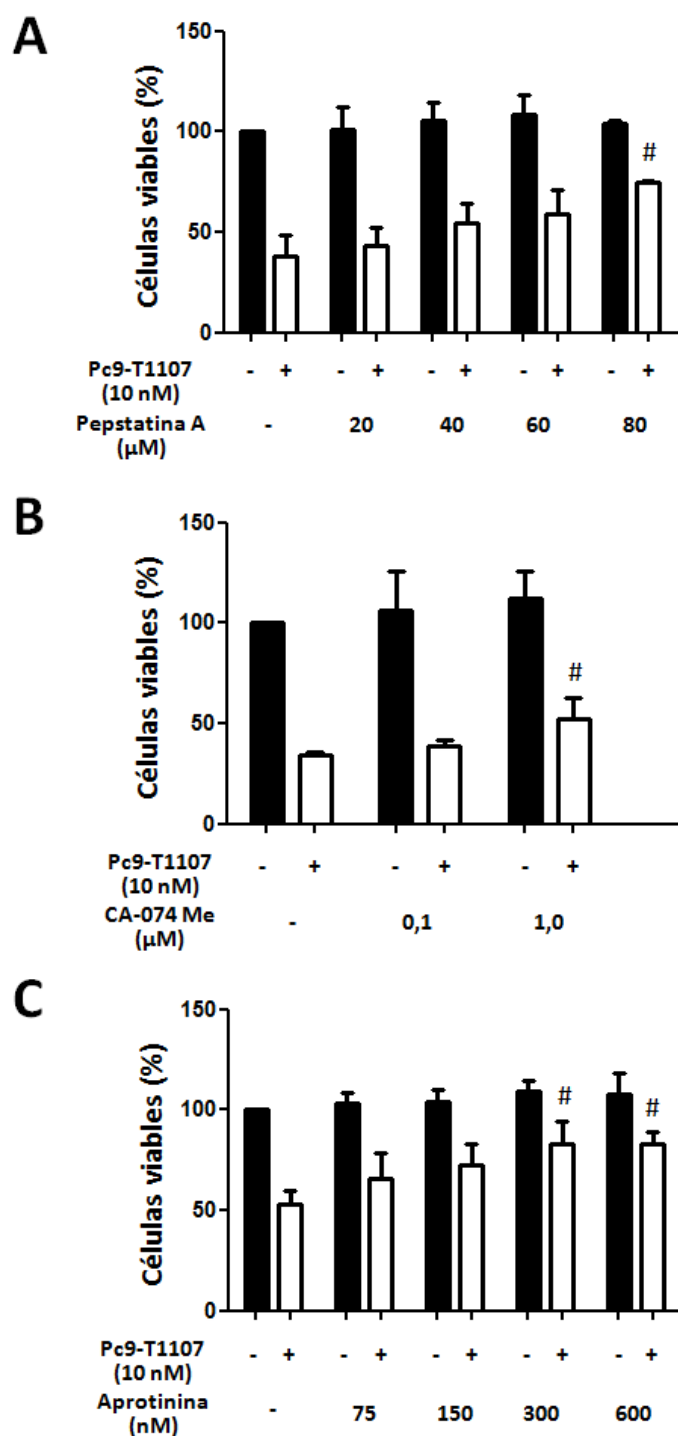


Figura 4.15. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la acción citotóxica de Pc9-T1107. Células CT26 tratadas o no con Pc9-T1107 10 nM fueron incubadas durante 1 h antes de la irradiación con distintas concentraciones de Pepstatina A (A), CA-074 Me (B) o aprotinina (C). A las 24 h p.i., la viabilidad celular fue determinada mediante el método de MTT. Los resultados están

expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. # $p < 0,05$ células sometidas a TFD significativamente distintas de células tratadas con Pc9-T1107 en ausencia de inhibidor.

4.8. Estrés de retículo endoplásmico.

La localización de Pc9 en el retículo endoplásmico nos llevó a indagar si la generación local de ROS podía desencadenar estrés en esta organela y alterar, en consecuencia, el normal funcionamiento del RE. Ha sido demostrado que una respuesta de estrés del RE puede llevar a un incorrecto plegamiento y tráfico de proteínas recientemente sintetizadas, así como producir modificaciones en los niveles de calcio intracelular e inclusive activar una respuesta apoptótica (Buytaert E. y col., 2007; Moserova I. y Kralova J., 2012). Algunos estímulos que afectan la normal síntesis y plegamiento proteico en el RE pueden desencadenar una respuesta conocida como UPR (del inglés *unfolded protein response*), que tiende a restaurar la homeostasis en esta organela (Schröder M. y Kaufman R.J., 2005; Szegezdi E. y col., 2006). La detección de una UPR es considerada, entonces, indicio de estrés de RE. Para evaluar si la TFD con Pc9-T1107 podía inducir estrés del RE decidimos cuantificar los niveles de expresión de ciertas chaperonas y los niveles de calcio intracelular.

4.8.1. Niveles de expresión de chaperonas

En primer lugar, determinamos mediante WB los niveles de expresión de diversas chaperonas que se encuentran sobre-expresadas en caso de existir UPR. Las chaperonas, durante la UPR, favorecen que las células recuperen su capacidad de producir proteínas correctamente plegadas y, por ende, funcionales.

En la Figura 4.16 se puede observar cómo la TFD modificó los niveles de expresión de GRP78/BIP, Calnexina, Hsp90 y Hsp110. Inmediatamente luego de la irradiación se produjo el aumento de Calnexina, mientras que a 1 h p.i. se detectó un incremento de GRP78/BIP. Por su parte, Hsp110 y Hsp90 recién incrementaron su expresión a las 3 h p.i.

4.8.2. Niveles de calcio intracelular y su participación en el proceso de muerte.

Luego, decidimos evaluar si los niveles de calcio intracelular se veían afectados por la TFD. El RE es uno de los principales reservorios de calcio dentro de la célula y, por ende, una consecuencia del daño de estas organelas es el aumento en los niveles intracelulares de calcio. Para cuantificar este catión se recurrió a la sonda fluorescente Fluo-4 AM, cuya emisión se ve aumentada al unirse a calcio catiónico.

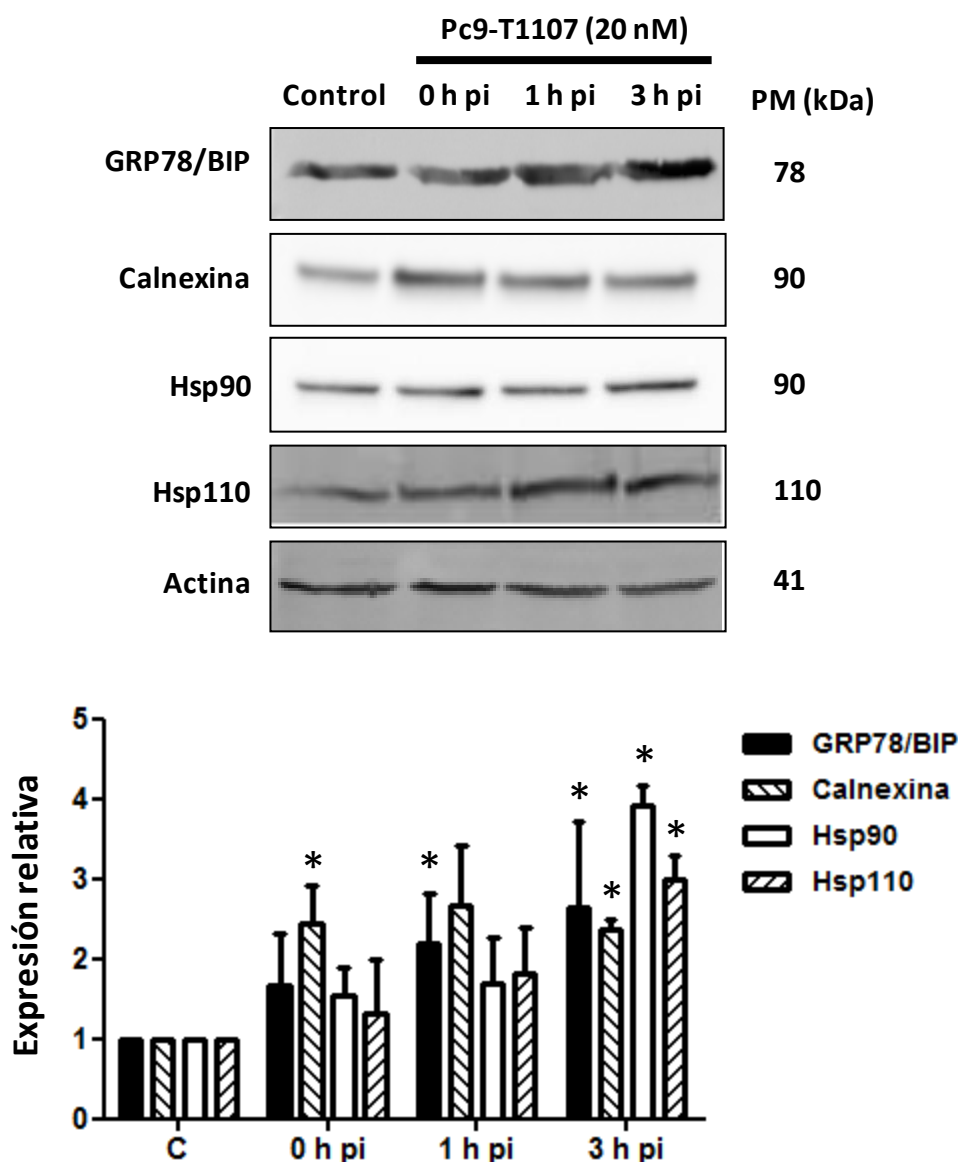


Figura 4.16. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles de expresión de chaperonas. Células CT26 fueron incubadas con una concentración 20 nM de Pc9-T1107. A distintos tiempos post-irradiación, se obtuvieron lisados celulares que fueron sometidos a WB. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas correspondientes al menos a tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Puesto que decidimos ensayar concentraciones variables de Pc9-T1107, y considerando que Pc9 cuenta con un átomo de zinc(II) en su estructura, en primer lugar evaluamos la posibilidad de que la señal de Fluo-4 AM se incrementase debido a uniones Zn-Fluo-4 AM que se podían producir al aumentar la concentración de Pc9. De esta manera, podíamos asegurarnos de que el incremento de la señal de emisión de Fluo-4 AM se debiera

específicamente a los niveles de calcio. Para ello, realizamos el procedimiento correspondiente a la medición de los niveles de calcio intracelulares incubando las células CT26 con distintas concentraciones de Pc9-T1107 en la oscuridad. En estas condiciones, en las cuales no se altera la viabilidad celular, evaluamos la emisión de Fluo-4 AM.

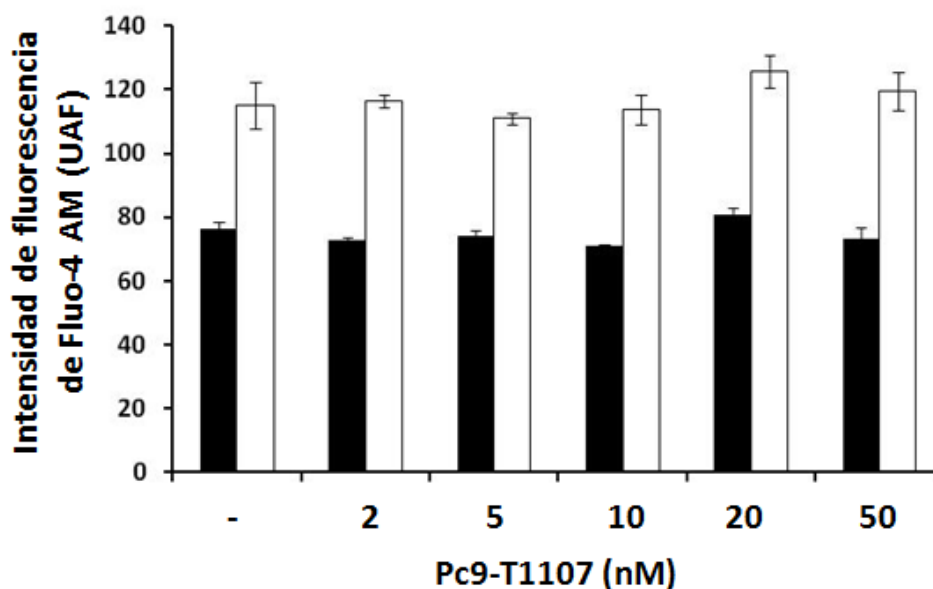


Figura 4.17. Efecto de Pc9-T1107 en la oscuridad sobre los niveles de Ca^{+2} intracelular. Células CT26 expuestas durante 24 h a distintas concentraciones de Pc9-T1107 fueron incubadas durante distintos tiempos con una solución 2 μM de Fluo-4 AM. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada a los 30 min (barras negras) o luego de 165 min (barras blancas) de incubación con la sonda. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. UAF representa unidades arbitrarias de fluorescencia.

En la Figura 4.17 se observa que, en ausencia de irradiación, la señal correspondiente a Fluo-4 AM no varió con la concentración de Pc9-T1107 en un rango entre 2 y 50 nM. Este resultado se corroboró tanto a los 30 como a los 165 min de incubación con la sonda. Se demostró entonces que Fluo-4 AM no se une al zinc(II) presente en Pc9.

A continuación, medimos la señal producida por la sonda Fluo-4 AM al tratar las células CT26 con Pc9-T1107 en concentraciones 2 nM (TFD que no provoca muerte celular), 10 nM (IC_{50}) y 20 nM ($2 \times \text{IC}_{50}$).

Como se muestra en la Figura 4.18, los niveles de calcio en células tratadas con una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron significativamente distintos a los de células control

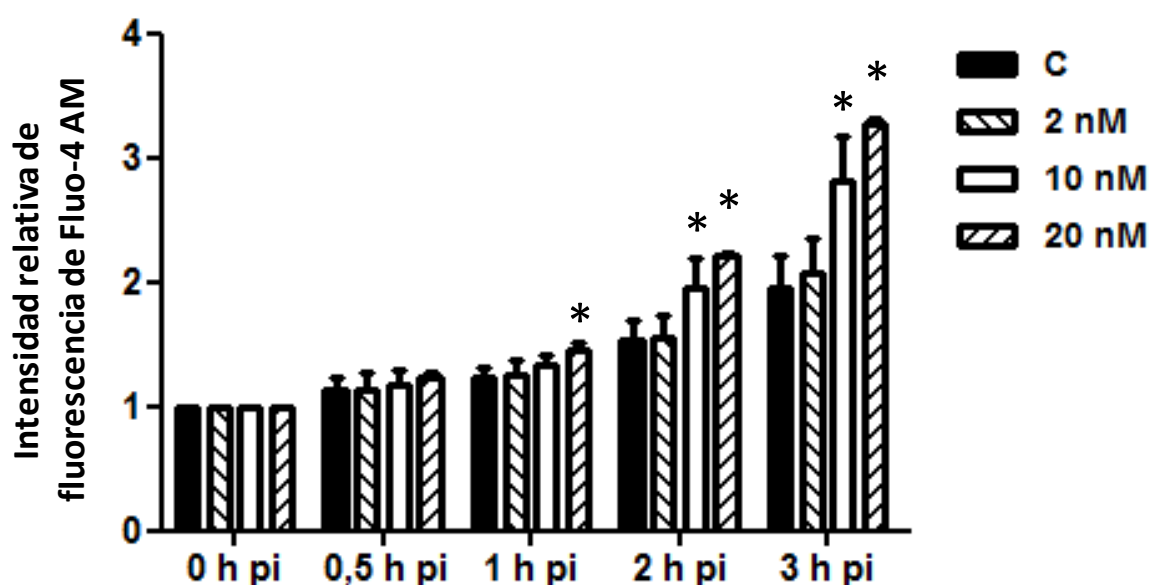


Figura 4.18. Efecto de la irradiación de Pc9-T1107 sobre los niveles de Ca^{+2} intracelular. Células CT26 expuestas a distintas concentraciones de Pc9-T1107 fueron incubadas durante 30 min antes de la irradiación con una solución 2 μM de Fluo-4 AM. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada a distintos tiempos post-irradiación mediante un fluorómetro de placas. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

a partir de 1 h p.i. Cuando se incubó con Pc9-T1107 en una concentración 10 nM, el incremento en la concentración de calcio citosólico fue percibido a las 2 h p.i. Si bien la señal fluorescente correspondiente a las células expuestas a una concentración 2 nM de Pc9-T1107 fue aumentando en función del tiempo, no se lograron detectar diferencias con respecto a células incubadas en ausencia del FS. La variación en el tiempo de la señal correspondiente al control fue atribuida al protocolo utilizado, ya que las células no fueron incubadas en estufa entre mediciones. En consecuencia, las células sufrieron un cierto estrés basal equiparable para todas las condiciones, que explicaría el aumento en los niveles de calcio citosólico.

Considerando que ya habíamos identificado que las ROS desempeñaban un papel trascendental en el proceso de muerte, decidimos evaluar si la inhibición de estas especies con un antioxidante afectaba los niveles de calcio post-TFD.

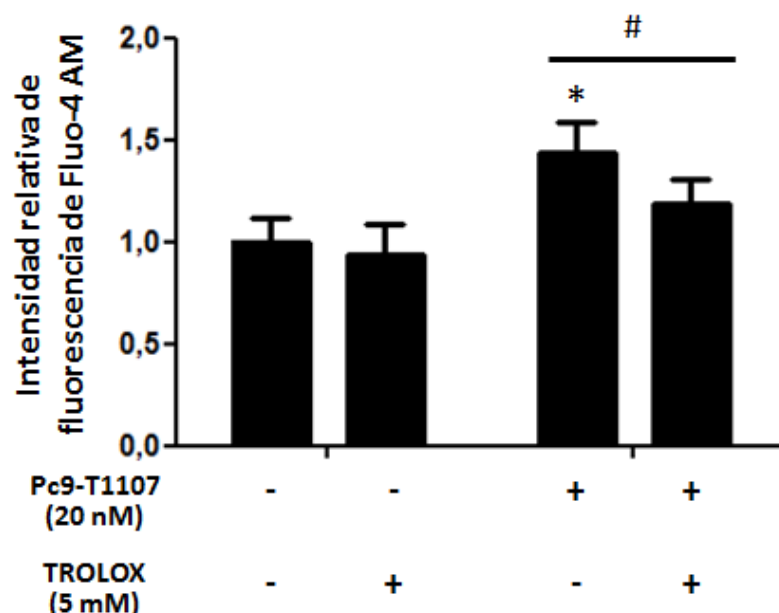


Figura 4.19. Efecto del anti-oxidante TROLOX sobre el aumento de Ca^{+2} intracelular producido por Pc9-T1107. Células CT26 expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 durante 24 h fueron incubadas 1 h con TROLOX (5 mM) y durante los 30 min previos a la irradiación con una solución 2 μM de Fluo-4 AM. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada a las 3 h p.i. mediante un fluorómetro de placas. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes, con respecto a los valores de fluorescencia obtenidos en ausencia de Pc9-T1107 y TROLOX. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107. # $p < 0,05$.

Como se observa en la Figura 4.19, cuando se agregó sólo el antioxidante TROLOX, en una concentración 5 mM (la más efectiva para evitar el efecto antiproliferativo de Pc9-T1107, ver Figura 4.9), no se produjeron alteraciones en la emisión de fluorescencia de Fluo-4 AM y, por ende, en los niveles de calcio intracelular. Sin embargo, cuando las células fueron irradiadas luego de la pre-incubación con TROLOX, se obtuvo una menor señal de Fluo-4 AM con respecto a células que sólo fueron sometidas a TFD, sugiriendo entonces que las ROS participan en el proceso de liberación de calcio desde el retículo endoplásmico al citosol.

Con el propósito de determinar si el incremento en los niveles de calcio citosólico era relevante para el mecanismo de muerte desencadenado por Pc9-T1107, procedimos a determinar la viabilidad celular con y sin un quelante específico para este catión, el BAPTA-AM. Es sabido que el calcio ejerce un importante rol como segundo mensajero y cofactor de proteínas involucradas en procesos de muerte (Ando H. y col., 2018; Hoorelbeke D. y col., 2018).

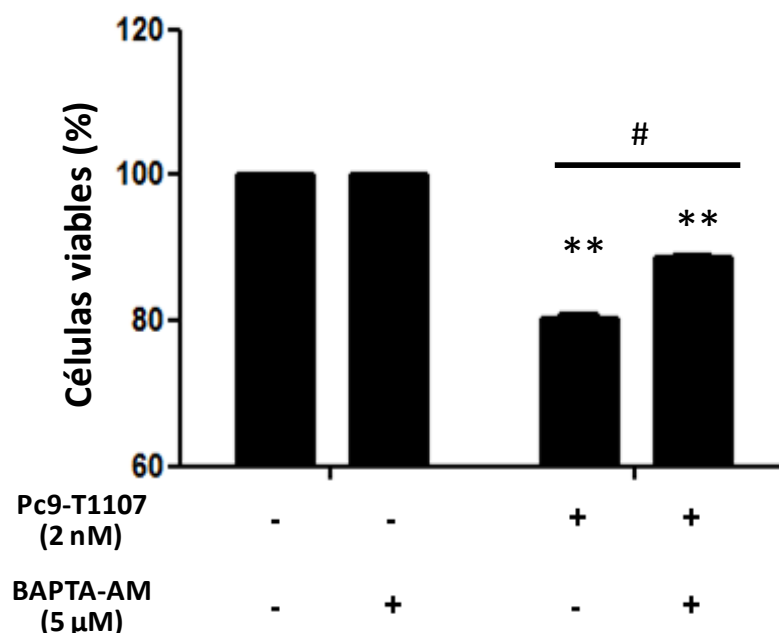


Figura 4.20. Efecto del quelante de calcio BAPTA-AM sobre la acción citotóxica de Pc9-T1107. Células CT26 expuestas o no durante 24 h a Pc9-T1107 (2 nM) fueron incubadas 1 h antes de la irradiación con BAPTA-AM 5 μM. La viabilidad celular fue determinada 24 h p.i. mediante el método de MTT. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes, con respecto a los valores de viabilidad obtenidos en ausencia de Pc9-T1107 y BAPTA-AM. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. ** $p < 0,005$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107. # $p < 0,05$.

En la Figura 4.20 se muestra que la pre-incubación de las células CT26 antes de la irradiación con un quelante de calcio previno el daño fototóxico de Pc9-T1107, mientras que el quelante *per se* no modificó la cantidad de células viables. En conclusión, los resultados sugieren que el calcio liberado desde el RE al citosol participa de procesos relevantes para promover la muerte celular debida a Pc9-T1107.

4.9. Despolarización de membranas mitocondriales.

Ha sido propuesto que la formación o la apertura de poros mitocondriales favorece la liberación de macromoléculas implicadas en procesos de muerte. La apertura prolongada del poro genera un desbalance iónico y en consecuencia la despolarización de la membrana mitocondrial con la consiguiente caída en la producción de ATP, pérdida de la función mitocondrial y eventual disminución de la viabilidad celular (Giorgio V. y col., 2018; Baxter P. y col., 2014). Debido a la importancia para la homeostasis celular que representa la correcta polarización de las membranas mitocondriales, decidimos evaluar el efecto de Pc9-T1107 sobre la integridad de las membranas mitocondriales. Para ello, se empleó la sonda lipofílica y catiónica sensible al potencial DiOC6(3) que se une a membranas mitocondriales

intactas, donde presenta su máxima capacidad de fluorescer. En células con membranas mitocondriales despolarizadas disminuye la capacidad de unión del DiOC6(3) y, por ende, también la emisión de fluorescencia verde.

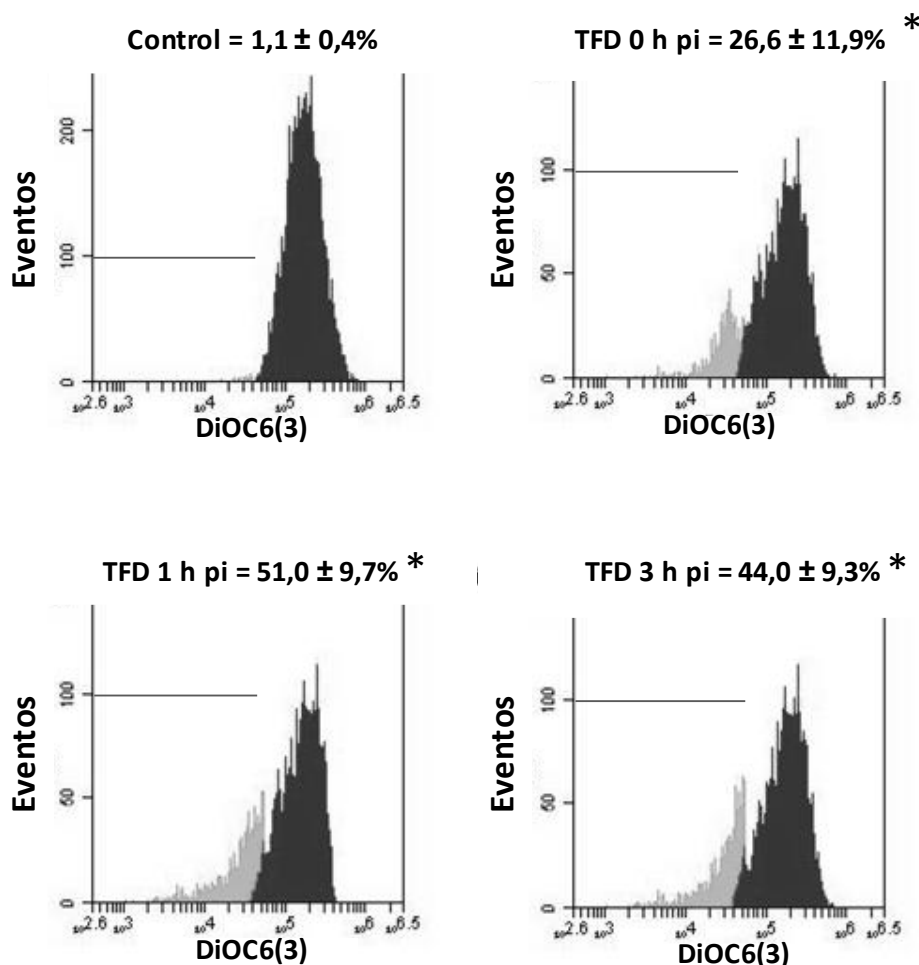


Figura 4.21. Efecto de Pc9-T1107 sobre el potencial de membrana mitocondrial. Células CT26 fueron expuestas o no durante 24 h a una concentración 20 nM de Pc9-T1107. Luego de la irradiación (0, 1 o 3 h p.i), las células fueron incubadas durante 30 min con DiOC6(3) (40 nM). La disminución en el $\Delta\Psi_m$ fue determinada mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes y representan el porcentaje de células con sus membranas mitocondriales despolarizadas. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se aprecia en la Figura 4.21, el histograma obtenido para células control mostró mayoritariamente una población homogénea de células con sus membranas mitocondriales intactas y alrededor de un 1% de células con membranas mitocondriales despolarizadas. Esta proporción aumentó significativamente luego de 0, 1 y 3 h p.i., siendo el porcentaje de

células con la membrana mitocondrial despolarizada de 26,6, 51,0 y 44,0% respectivamente.

4.10. Niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2.

Con el propósito de complementar la caracterización del mecanismo de acción de Pc9-T1107, decidimos evaluar mediante WB los niveles de expresión de una serie de proteínas anti y pro-apoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2. Como se explicó detalladamente en la Introducción, los miembros de esta familia de proteínas cumplen roles trascendentales en relación a la formación del poro mitocondrial (Green D.R. y Llambi F., 2015).

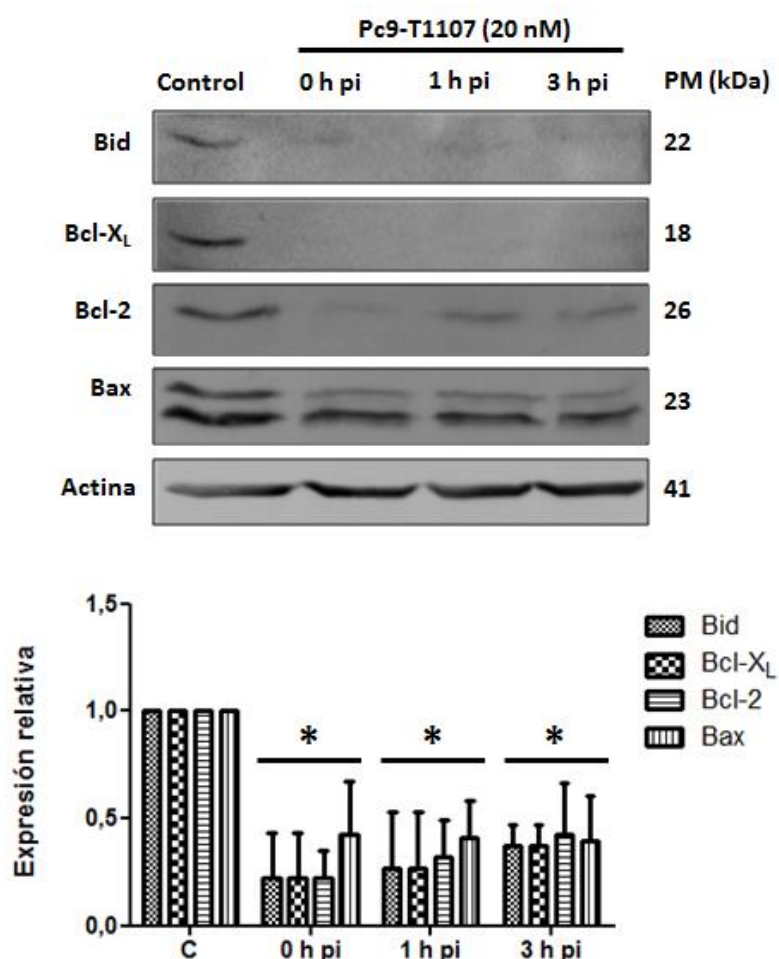


Figura 4.22. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2. Células CT26 fueron expuestas o no durante 24 h a una concentración 20 nM de Pc9-T1107. A distintos tiempos post-irradiación se obtuvieron lisados celulares que fueron sometidos a WB. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se puede observar en la Figura 4.22, la TFD provocó el descenso en los niveles de Bid apenas se completaron los 40 min de irradiación, o sea, en el momento considerado 0 h p.i. La disminución de Bid podría ser atribuida a la formación de un fragmento con características pro-apoptóticas, denominado Bid truncado (tBid). En cuanto a Bcl-2 y Bcl-X_L, la expresión de ambas proteínas anti-apoptóticas disminuyó luego de 0, 1 y 3 h p.i.

Llamativamente, los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax se encontraron disminuidos. A pesar de este resultado, tanto el descenso en los niveles de Bid, Bcl-2 y Bcl-X_L, como la posible participación de otras proteínas pro-apoptóticas no determinadas en este trabajo (Bak, Bim, Bad, Noxa, etc.) podrían contribuir a desencadenar una respuesta apoptótica. Otro aspecto a considerar es que el clivaje de Bax favorezca la formación de un fragmento más pro-apoptótico, tal como ha sido descrito por Toyota H. y col. (2003). Esta disminución, en principio inusual, en los niveles de Bax nos llevó a investigar luego este tema con mayor detalle (ver próxima sección).

4.11. Análisis del rol de las calpaínas en el proceso de muerte.

Las calpaínas son un grupo de cisteín-proteasas dependientes de calcio y activadas durante el estrés de RE (Dougherty T.J. y col., 1998; Moserova I. y Kralova J., 2012). Se ha descrito que tienen funciones biológicas similares a las de ciertas caspasas y que poseen la capacidad de clivar proteínas de la familia Bcl-2 (Buytaert E. y col., 2007; Almeida R.D. y col., 2004; Oleinick N.L. y col., 2002). Sobre la base de estos antecedentes, decidimos inspeccionar el rol de estas proteasas en el mecanismo de muerte celular desencadenado por Pc9-T1107 utilizando para ello un inhibidor de calpaínas llamado PD 150606.

Como se muestra en la Figura 4.23A, la pre-incubación con PD 150606 no resultó tóxica *per se* en las concentraciones de 5, 50 y 100 μ M (barras negras). Cuando las células CT26 pre-incubadas con las mismas concentraciones del inhibidor y cargadas con Pc9-T1107 fueron irradiadas (barras blancas), se logró prevenir el efecto citotóxico de la TFD con concentraciones 50 y 100 μ M.

Asimismo, en un experimento representativo de WB (Figura 4.23B), se observa que la pre-incubación con una concentración 50 μ M de PD 150606 redujo el clivaje de la proteína pro-apoptótica Bax. El análisis densitométrico de los resultados obtenidos en tres experimentos

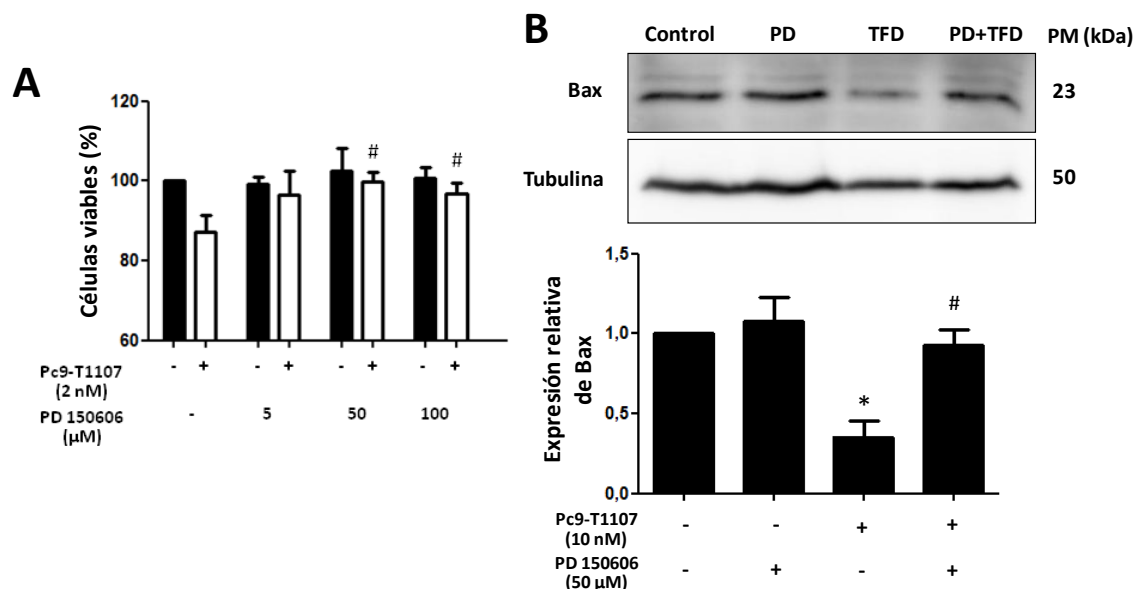


Figura 4.23. Efecto del inhibidor de calpaínas PD 150606 sobre la acción citotóxica de Pc9-T1107 y el clivaje de Bax. (A) Células CT26 fueron co-incubadas durante 24 h con una solución 2 nM de Pc9-T1107 y distintas concentraciones de PD 150606. 24 h después de la irradiación, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de MTT. (B) Células CT26 fueron co-incubadas durante 24 h con una solución 10 nM de Pc9-T1107 y 50 μM de PD 150606. 1 h después de la irradiación, se generaron lisados celulares que fueron sometidos a WB utilizando un anticuerpo específico para Bax. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107. # $p < 0,05$ significativamente distinto de células tratadas con Pc9-T1107 en ausencia de inhibidor.

independientes confirmó que la inhibición de calpaínas evita casi en su totalidad la injuria sobre Bax. Mientras que en células sometidas a TFD los niveles de Bax se redujeron en un 65%, esta reducción fue sólo de un 8% en presencia de una concentración 50 μM de PD 150606.

4.12. Activación de caspasas.

4.12.1. Niveles de procaspasa 3.

Con el propósito de explorar la participación de caspasas en la respuesta celular provocada por el tratamiento con Pc9-T1107, se procedió inicialmente a cuantificar mediante WB los niveles de procaspasa 3. Esta proteína es una proforma precursora inactiva que por clivaje proteolítico da lugar a la enzima activa caspasa 3, una de las proteínas ejecutoras característica en los procesos apoptóticos.

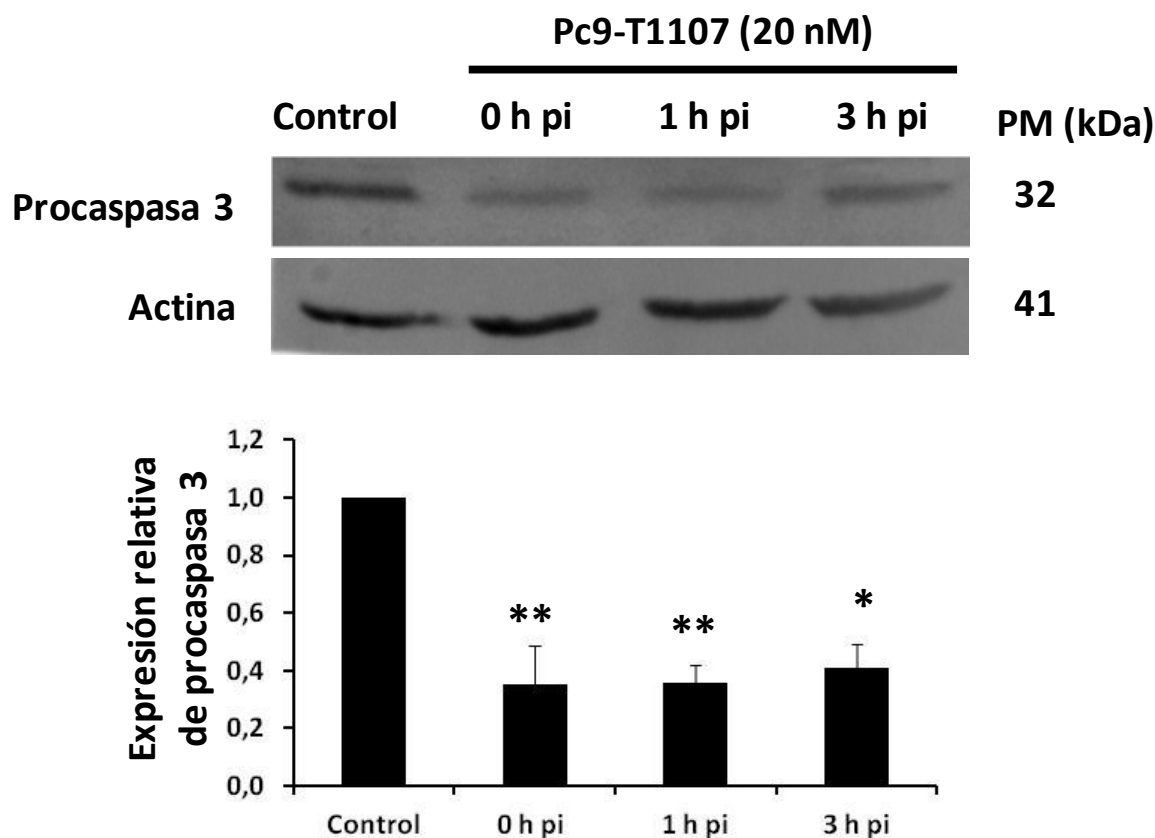


Figura 4.24. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles de procaspasa 3 en cultivos bidimensionales de células CT26. Células expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas e incubadas durante distintos tiempos. Los lisados celulares obtenidos fueron sometidos a WB utilizando un anticuerpo específico para procaspasa 3. En el panel izquierdo se presenta un experimento representativo, mientras que en el derecho se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se observa en la Figura 4.24, los niveles de procaspasa 3 detectados en células control disminuyeron significativamente luego de la TFD con Pc9-T1107. Esto ocurrió inmediatamente finalizada la irradiación y se mantuvo luego de 1 y 3 h p.i., lo que sugeriría el rápido aumento en los niveles de caspasa 3 activa.

4.12.2. Actividad de caspasa 3, 8 y 9.

El estudio del posible clivaje de procaspasa 3 fue además realizado mediante evaluaciones de la actividad de caspasa 3. También, procedimos a cuantificar las actividades de las caspasas iniciadoras 8 y 9. Para ello, se utilizaron sustratos que poseen una secuencia consenso de clivaje específica para cada caspasa. Al ser clivados por estas proteasas, se genera un producto fluorescente, el cual es cuantificado con un fluorómetro.

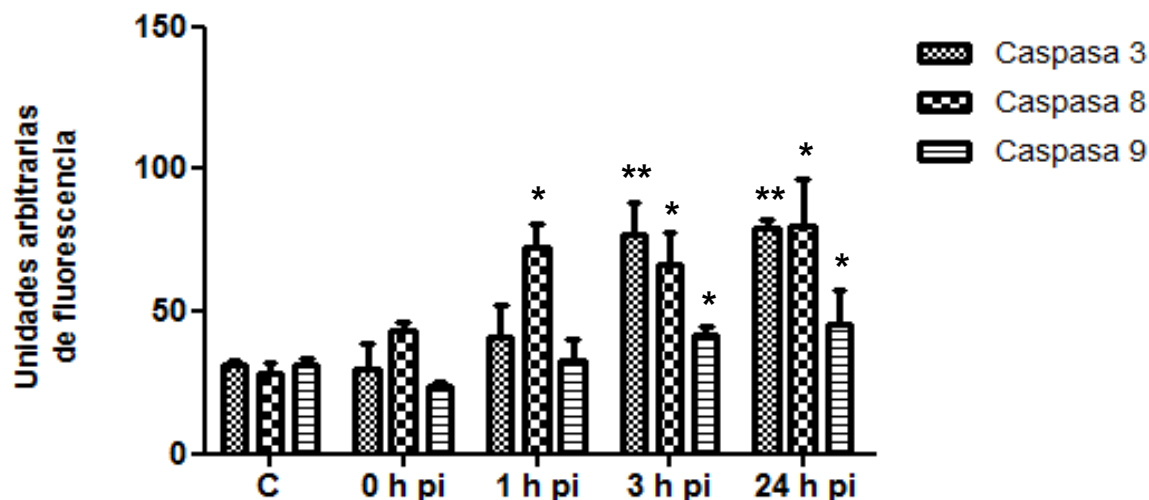


Figura 4.25. Efecto de Pc9-T1107 sobre la actividad de las caspasas 3, 8 y 9. Células CT26 fueron expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 durante 24 h y luego irradiadas. Los lisados celulares (100 µg de proteínas) generados a distintos tiempos p.i. fueron incubados con 50 µg de los correspondientes sustratos fluorogénicos para caspasa 3 (Ac-DEVD-AMC), caspasa 8 (Z-IETD-AFC) o caspasa 9 (Ac-LEHD-AMC). El clivaje de los sustratos fue monitoreado utilizando un fluorómetro. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se muestra en la Figura 4.25, la primera caspasa en aumentar su actividad fue la caspasa 8, una hora después de la irradiación. A las 3 h p.i. no sólo permaneció incrementada la actividad de la caspasa iniciadora 8, sino que además se detectó una mayor actividad para las caspasas 3 y 9. Esta situación se prolongó, al menos, hasta las 24 h p.i. Estos resultados revelaron que la TFD con Pc9-T1107 es un proceso apoptótico dependiente de caspasas mediado por la activación de las proteasas iniciadoras 8 y 9, y de la efectora 3.

4.12.3. Niveles de procaspasa 12 y su relación con calpaínas.

La procaspasa 12 es una proteasa que se ubica en la membrana del RE. Esta caspasa murina, homóloga de la caspasa 4 humana, una vez activada puede participar en el clivaje de procaspasa 9 a caspasa 9 en forma independiente de la vía mitocondrial (Morishima N. y col., 2002; Rao R.V. y col., 2002; Liu D. y col., 2013). La activación de procaspasa 12 se da principalmente de dos formas en un contexto de estrés del RE (Orrenius S. y col., 2003). Por un lado, puede ser clivada por calpaínas, mientras que por el otro puede ser reclutada por el complejo conformado por las proteínas IRE1 y TRAF-2, donde se favorece su clivaje.

Habiendo previamente comprobado que como consecuencia de la TFD con Pc9-T1107 se inducía una UPR, decidimos, entonces, evaluar si el clivaje de procaspasa 12 era también un evento producido por la terapia y si ese proceso estaba mediado por calpaínas. Con este objetivo se utilizó el inhibidor de calpaínas PD 150606.

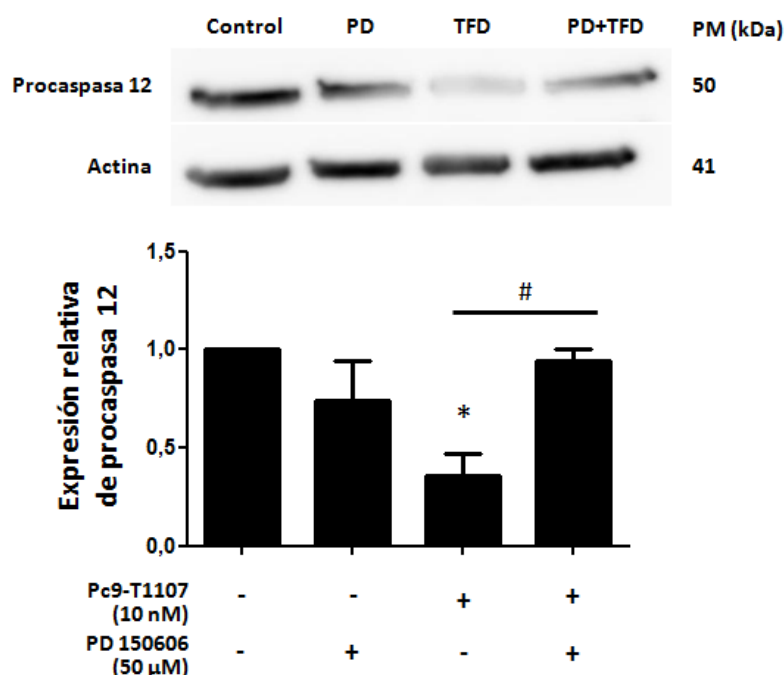


Figura 4.26. Efecto del inhibidor de calpaínas PD 150606 sobre el clivaje de procaspasa 12. Células CT26 fueron co-incubadas durante 24 h con una solución 10 nM de Pc9-T1107 y 50 μM de PD 150606. 1 h luego de la irradiación, se obtuvieron lisados celulares que fueron sometidos a WB utilizando un anticuerpo específico para procaspasa 12. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media ± ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107. # $p < 0,05$.

Como se observa en la Figura 4.26, la TFD provocó una marcada disminución en los niveles de procaspasa 12 (64%). Asimismo, se evidenció que la inhibición de calpaínas mediante el uso de PD 150606 evitó el descenso en los niveles de la proteasa, sugiriendo la participación de las calpaínas en la generación de la forma activa de caspasa 12.

4.13. Evaluación del rol de Catepsina D.

A partir de la interpretación de los resultados presentados en la Figura 4.15 pudimos evidenciar que Pepstatina A, inhibidor de la proteasa lisosomal Catepsina D, posee una importante capacidad para impedir la acción de Pc9-T1107. Según algunos autores, la participación de Catepsina D en procesos de muerte produciría la activación de procaspasa

8 (Conus S. y col., 2008; Marino J. y col., 2013) y el clivaje de Bid para generar el fragmento pro-apoptótico tBid implicado en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Stoka V. y col., 2011; Reiners J.J.Jr. y col., 2002; Droga-Mazovec G. y col., 2008; Appelqvist H. y col., 2012). Decidimos entonces evaluar si estos mecanismos se encontraban presentes en nuestro modelo.

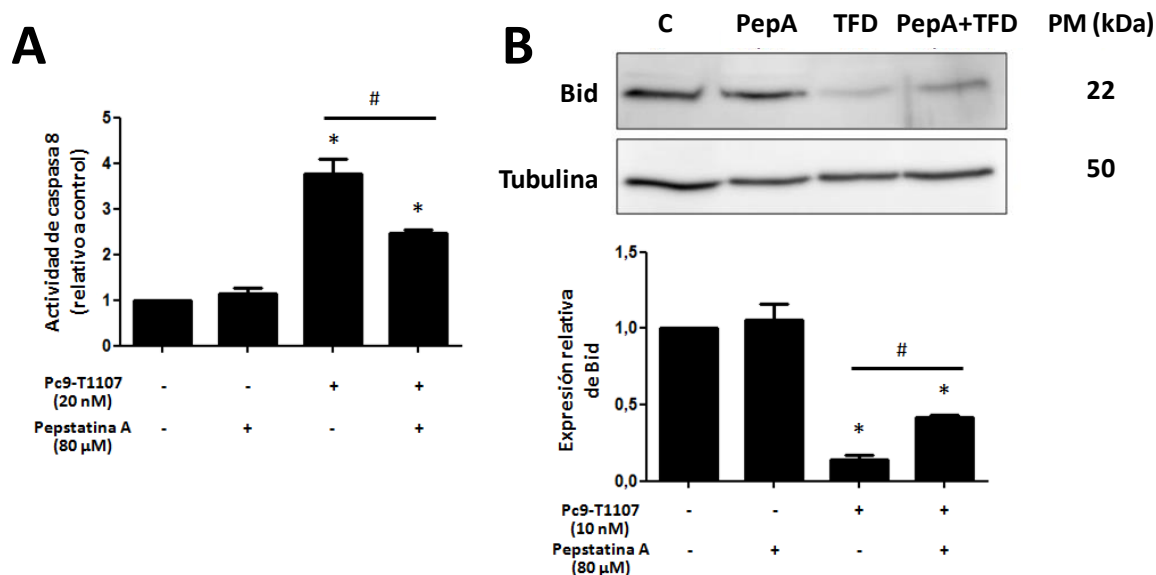


Figura 4.27. Efecto de Pepstatina A, inhibidor de Catepsina D, sobre la activación de procaspasa 8 y el clivaje de Bid producidos por Pc9-T1107. (A) Células CT26 fueron expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 durante 24 h y luego a una solución 80 μ M de Pepstatina A durante la hora previa a la irradiación. Los lisados celulares (100 μ g de proteínas) obtenidos 1 h p.i., fueron incubados con 50 μ g del sustrato fluorogénico para caspasa 8 (Z-IETD-AFC) y la actividad determinada como se indica en Materiales y Métodos. (B) Células CT26 fueron expuestas durante 24 h a una solución 10 nM de Pc9-T1107, y luego incubados con 80 μ M de Pepstatina A durante la hora previa a la irradiación. Los lisados celulares obtenidos 1 h p.i. fueron sometidos a WB empleando un anticuerpo específico para Bid. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107 e inhibidor. # $p < 0,05$.

Como se observa en la Figura 4.27A, el pre-tratamiento con Pepstatina A no alteró *per se* la actividad de caspasa 8. Luego de la TFD con Pc9-T1107 se observó un aumento en la actividad de caspasa 8, tal como fue previamente mostrado (Figura 4.25). Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con Pepstatina A (80 μ M) antes de la TFD, el incremento en la actividad enzimática fue menor. Así, puesto que al inhibirse la Catepsina D

la actividad de caspasa 8 se redujo en un 35%, concluimos que esta proteasa lisosomal participa en el clivaje y activación de la procaspasa 8.

Asimismo, la inhibición de Catepsina D con Pepstatina A (Figura 4.27B) dio como resultado mayores niveles de Bid. Por ende, se estarían generando menores cantidades de la forma pro-apoptótica tBid. A partir del análisis densitométrico de los resultados, se concluye que existe una diferencia significativa (aumento del 28%) en los niveles de expresión de Bid entre células sometidas a TFD y células pre-incubadas con Pepstatina A y luego sometidas a TFD, sugiriendo que la Catepsina D participa también en el clivaje de Bid.

4.14. Alteraciones en la morfología celular.

El mecanismo de muerte por apoptosis se caracteriza por una disminución del volumen celular (García de la Cadena S. y Massieu L., 2016; Buytaert E. y col. 2007). Es por ello que, en nuestras condiciones experimentales, decidimos evaluar este parámetro. Para ello, obtuvimos fotografías de las células a tiempos 0, 1, 3, 6 y 24 h p.i., utilizando un microscopio óptico con una cámara fotográfica adosada.

Las imágenes presentadas en la Figura 4.28 muestran cómo a mayor tiempo post-irradiación se observó un menor número de células en cada campo. Además, se observaron algunas alteraciones morfológicas, como una disminución del tamaño celular y la pérdida de prolongaciones o de aspecto fusiforme, modificaciones que se hicieron más notorias a medida que transcurría el tiempo p.i.

4.15. Alteraciones en la morfología nuclear.

La apoptosis se diferencia de otros procesos de muerte celular por la condensación de la cromatina en el núcleo (García de la Cadena S. y Massieu L., 2016; Buytaert E. y col., 2007). Una técnica utilizada para evaluar la integridad y/o el grado de condensación del ADN consiste en la marcación de células con Hoechst 33258, una sonda fluorescente de

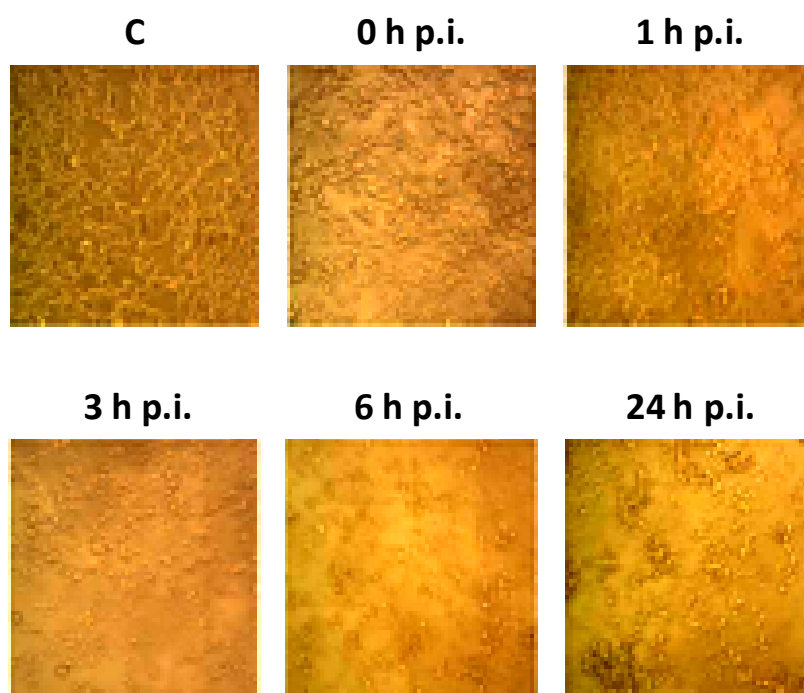


Figura 4.28. Efecto de Pc9-T1107 sobre el número de células y su morfología. Fotografías de campo claro obtenidas a distintos tiempos p.i. para células tratadas con Pc9-T1107 (20 nM). Aumento: 100X.

localización nuclear. Es por ello que, luego de teñir las células CT26 con esta sonda, se observaron las características del ADN nuclear por microscopía de fluorescencia.

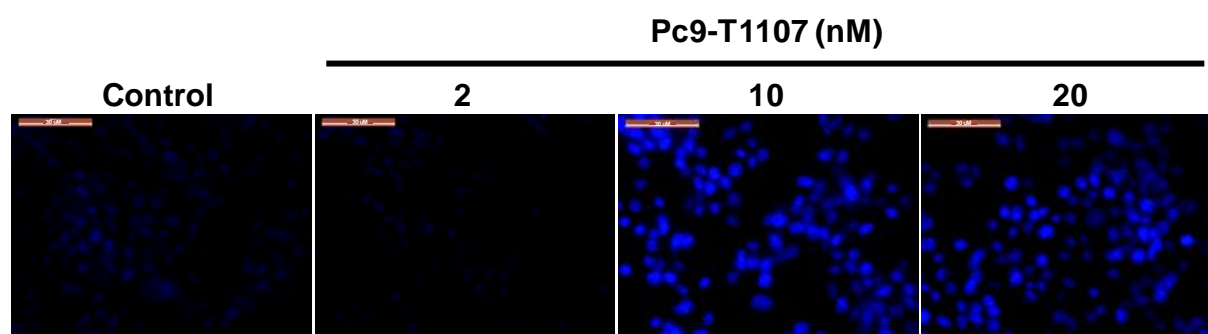


Figura 4.29. Efecto de Pc9-T1107 sobre la morfología nuclear en cultivos bidimensionales de células CT26. Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron expuestas durante 24 h a distintas concentraciones de Pc9-T1107. Inmediatamente finalizada la irradiación, las células fueron fijadas y preparadas para su visualización incorporando Hoechst 33258 (2 µg/ml) al líquido de montaje. Los núcleos fueron inspeccionados mediante microscopía de fluorescencia. Aumento: 400X.

Como se observa en la Figura 4.29, las imágenes obtenidas para células control y tratadas con 2 nM de Pc9-T1107 fueron muy similares. Este resultado indica que no se

produjo daño a nivel nuclear al tratar las células CT26 con una concentración 5 veces menor a la IC₅₀, que no produce disminución de la viabilidad celular. Por el contrario, cuando se utilizó TFD en células conteniendo concentraciones 10 y 20 nM, las alteraciones nucleares fueron notables, incluyendo núcleos altamente condensados típicos de apoptosis.

4.16. Determinación del porcentaje de células hipodiploides.

Una característica del proceso de muerte por apoptosis es el clivaje del ADN nuclear, que genera fragmentos de menor tamaño (García de la Cadena S. y Massieu L., 2016; Buytaert E. y col., 2007). Estas células con menor contenido de ADN que el de las células diploides son llamadas hipodiploides. La determinación de la proporción de células hipodiploides a distintos tiempos p.i. se llevó a cabo como se indicó en Materiales y Métodos (sección 2.2.1.13). El análisis de las células por citometría de flujo luego de su tinción con ioduro de propidio permite discernir un pico característico de células diploides, un valle compuesto por células con mayor contenido de ADN que se encuentran en proceso de replicación de su material genético, y un segundo pico conformado por células tetraploides, que ya duplicaron su contenido de ADN.

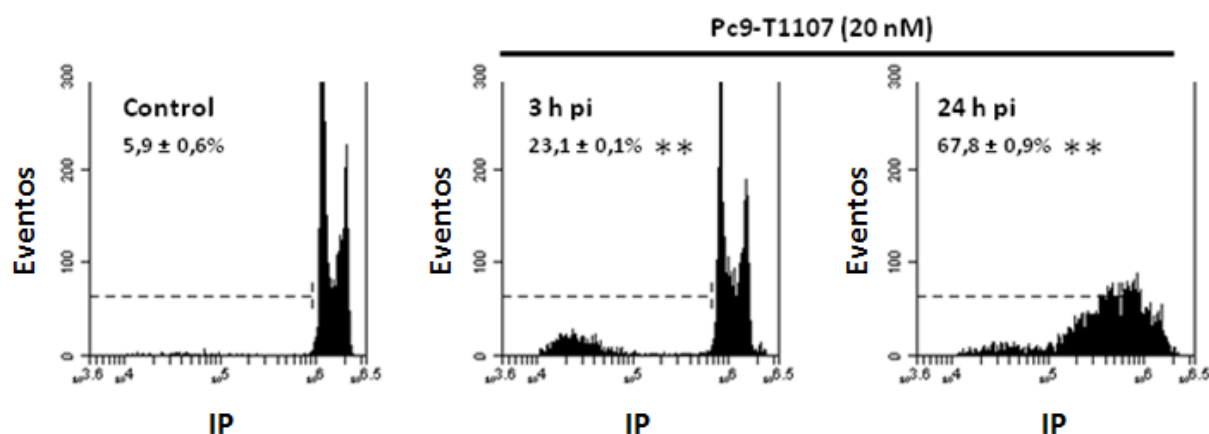


Figura 4.30. Efecto de Pc9-T1107 sobre la proporción de células hipodiploides. Células CT26 incubadas durante 24 h con una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas y, luego de distintos tiempos p.i., las células fueron fijadas e incubadas durante 24 h con buffer conteniendo IP, un fluoróforo que se une al ADN. Finalmente, la población de células con ADN hipodiploide fue cuantificada mediante citometría de flujo. Se presentan histogramas representativos de cada condición que muestran el porcentaje de células con ADN hipodiploide. Los resultados están expresados como la media ± ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. **p<0,005 significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se observa en los histogramas de la Figura 4.30, el porcentaje de células hipodiploides, o población sub-G1, fue el 5,9% en células control y 23,1% en células tratadas luego de 3 h p.i. Este fenómeno se vio acentuado a las 24 h p.i., donde la proporción de células hipodiploides representó el 67,8%.

4.17. Análisis de los niveles de PARP-1.

También determinamos si el tratamiento de las células modificaba los niveles de PARP-1, una proteína que participa en la reparación del ADN (Rodríguez-Hernández A. y col., 2006; Hassa P.O. y Hottiger M.O., 2008). La generación de un fragmento de 89 kDa a partir de PARP-1 (116 kDa) se atribuye a la acción de caspasa 3 y es definido por varios expertos como un evento característico (o *hallmark*) de apoptosis.

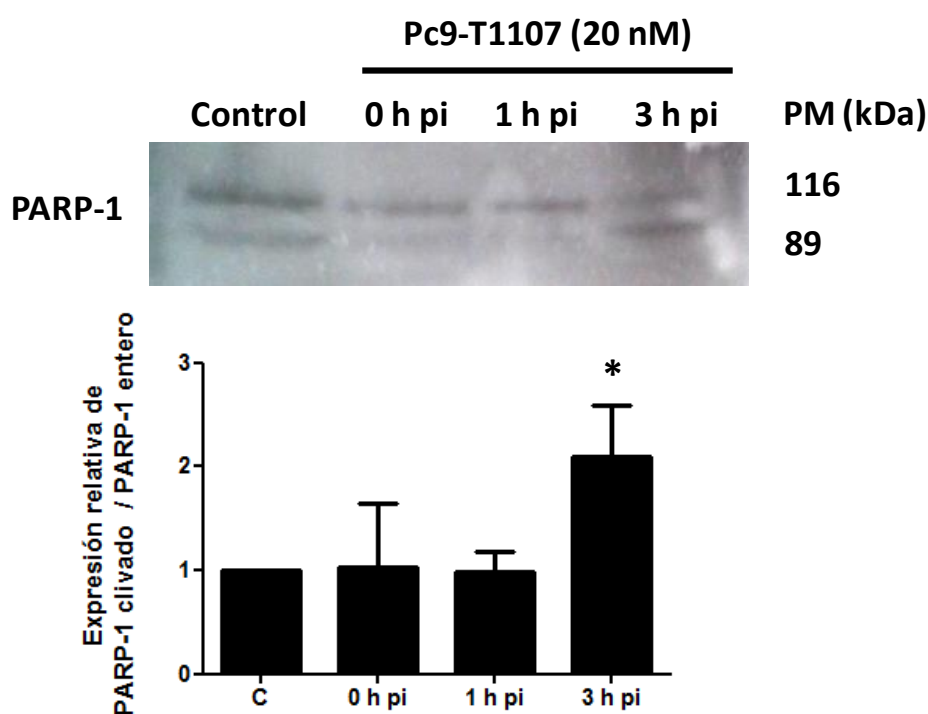


Figura 4.31. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles de PARP-1 (116 kDa) y del fragmento de 89 kDa. Células CT26 expuestas a una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas e incubadas durante distintos tiempos. Los lisados celulares obtenidos fueron sometidos a WB utilizando un anticuerpo específico para PARP-1. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES con respecto a células no tratadas con Pc9-T1107. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se muestra en la Figura 4.31, el cociente de los niveles de expresión del fragmento de PARP-1 (89 kDa) sobre PARP-1 (116 kDa) fue significativamente mayor al de células control luego de 3 h p.i., indicando que el clivaje de PARP-1 estaría limitando la capacidad de la polimerasa de ejercer su rol biológico como reparadora del ADN.

4.18. Evaluación del ciclo celular.

Diversas anomalías en la homeostasis celular, como el daño en el material genético, pueden alterar el normal desarrollo del ciclo celular llevando al arresto del mismo en alguna de sus fases (García V. y col., 2016). Con el objetivo de evaluar si la TFD con Pc9-T1107 producía cambios en la normal distribución celular en las fases del ciclo, cuantificamos los niveles de emisión de una sonda fluorescente que se une al ADN, el yoduro de propidio. Las determinaciones fueron realizadas mediante citometría de flujo.

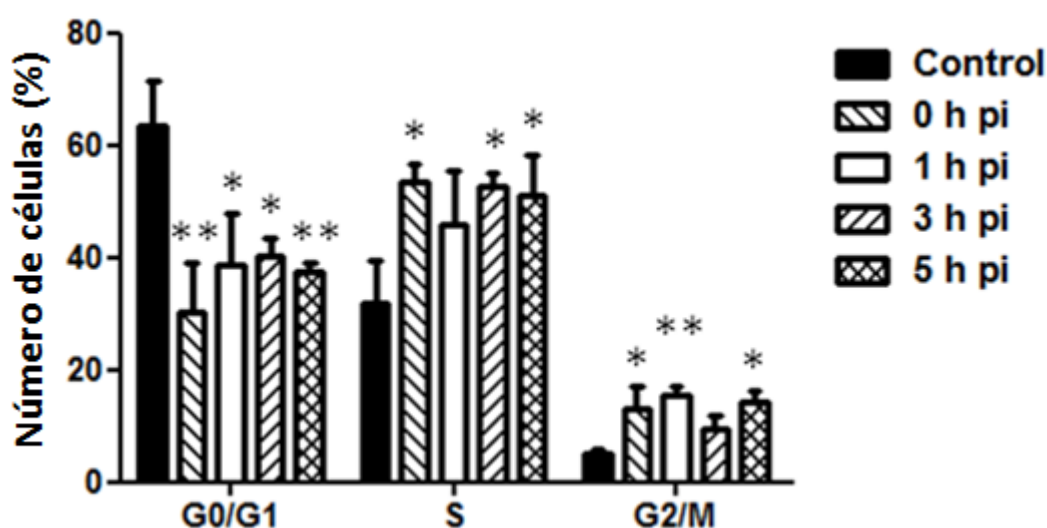


Figura 4.32. Efecto de Pc9-T1107 sobre el ciclo celular. Células CT26 incubadas durante 24 h con una concentración 20 nM de Pc9-T1107 fueron irradiadas y, a distintos tiempos p.i., las células fueron fijadas e incubadas durante 24 h con buffer conteniendo IP. Este fluoróforo al unirse al ADN posibilita su cuantificación. Finalmente, mediante citometría de flujo se estimó el porcentaje de células en cada fase del ciclo. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

En la Figura 4.32 se muestra que la TFD con Pc9-T1107 produjo una alteración en el ciclo celular apenas concluida la irradiación. El porcentaje de células en fase G0/G1 se redujo de aproximadamente un 60% en células control, a un 30% en células tratadas con una solución 20 nM de Pc9-T1107. En cambio, luego del tratamiento se observó un incremento en la población de células en la fase S de 30 a 50%, y en la fase G2/M de 5 a

10%, a distintos tiempos post-irradiación (entre 0 y 5 h p.i.). En síntesis, la iluminación de células CT26 conteniendo Pc9-T1107 produjo rápidamente una alteración en el ciclo celular caracterizada por el arresto del ciclo en la fase G2/M y prolongación de la fase S.

4.19. Efecto de inhibidores de autofagia sobre la acción fototóxica de Pc9-T1107 .

Si bien demostramos que la TFD con Pc9-T1107 desencadena una muerte de tipo apoptótica, no es posible descartar la participación de otros mecanismos de muerte celular. Dentro de las subclases de autofagia (ver Introducción, sección 1.1.4.2), la macroautofagia es un proceso mediante el cual una célula puede dirigirse hacia su muerte o tratar de evitarla, mediante el reciclaje de macromoléculas dañadas. Con el fin de determinar si además de apoptosis la TFD inducía macroautofagia, decidimos realizar ensayos de viabilidad celular con inhibidores de este proceso.

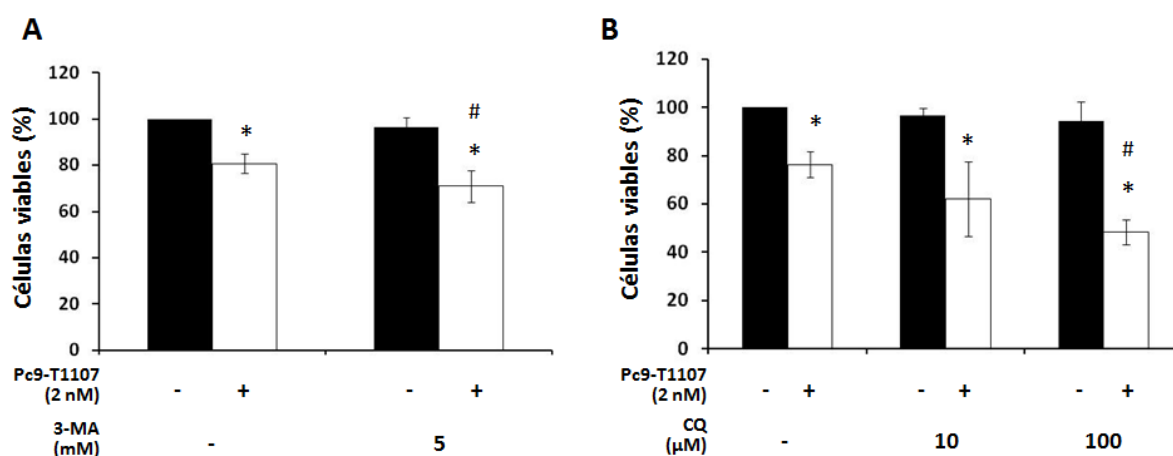


Figura 4.33. Efecto de inhibidores de autofagia sobre la muerte celular inducida por Pc9-T1107. Luego del tratamiento fotodinámico con una concentración 2 nM de Pc9-T1107, la viabilidad celular fue determinada mediante el método de MTT (A) o Hexosaminidasa (B) en células pre-incubadas con 3-metiladenina (A) o cloroquina (B). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107 e inhibidor. # $p < 0,05$ células sometidas a TFD significativamente distintas de células tratadas con Pc9-T1107 en ausencia de inhibidor.

Como se observa en la Figura 4.33A, la incubación de células CT26 con 3-metiladenina (3-MA), previa a la irradiación, produjo una disminución en la viabilidad celular más marcada que la obtenida al aplicar la TFD sola. 3-MA inhibe a las fosfatidilinositol-3-quinazas (PI3K) de clase III, involucradas en el tráfico de proteínas y vesículas. Por ende, 3-MA dificulta la formación del autofagosoma, lo que la convierte en un inhibidor de etapas tempranas de la macroautofagia. En cambio, el otro inhibidor ensayado, la cloroquina (Figura 4.33B), es un

inhibidor de etapas tardías de la macroautofagia, ya que al aumentar el pH lisosomal no permite la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Para este compuesto se requirió utilizar una concentración 100 μ M para obtener un resultado análogo al de 3-MA, es decir, una disminución mayor en la viabilidad celular que la obtenida al aplicar la TFD sobre las células CT26.

En su conjunto, estos resultados demostraron que la inhibición de la macroautofagia condujo a una reducción más marcada en el porcentaje de células CT26 viables. Aunque resta aún caracterizar con mayor detalle este proceso, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la autofagia, en este modelo, es un mecanismo tendiente a contrarrestar la TFD y favorecer la sobrevida.

4.20. Discusión.

Con el objetivo de probar la eficacia de la formulación Pc9-T1107 en el tratamiento del CCR, se evaluó su potencia citotóxica en cuatro líneas celulares de carcinoma de colon. Para ello, se procedió a realizar ensayos de viabilidad celular. El valor de IC₅₀ obtenido en la línea murina CT26 fue 10 \pm 2 nM, del mismo orden que los calculados para otras líneas celulares de origen humano (Caco-2, HT-29, SW480). Las líneas humanas utilizadas fueron seleccionadas con el propósito de tener un panel diverso de células tumorales que representan diferentes subtipos de CCR. Las diferencias entre las líneas consistieron en el grado de avance de la patología, el fenotipo metilador o no de islas CpG, así como variaciones en su perfil genético en cuanto a oncogenes (*BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA*) y genes supresores de tumor (*PTEN*, *TP53*) (Ahmed D. y col., 2013). Demostramos que la potencia de Pc9-T1107 no depende del tipo celular estudiado ni de sus características fenotípicas y genotípicas. Al contrastar la eficacia de Pc9-T1107 con la de otros FSs en ensayos preclínicos para el tratamiento del CCR, encontramos que Pc9-T1107 es una formulación más potente. Así, por ejemplo, Li Y. y col. (2018) describieron una potencia 10 veces menor en la línea CT26 para una nanopartícula compleja cargada con porfirinas en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (ligando 1 de muerte programada), mientras que Khot M.I. y col. (2018), reportaron una IC₅₀ 5 veces mayor a la de Pc9-T1107 empleando Hipericina como FS en las líneas humanas HT29 y HCT116 de CCR.

Las células CT26 seleccionadas para caracterizar el mecanismo de acción de Pc9-T1107 poseen la ventaja de formar cultivos tridimensionales (esferoides) y permiten desarrollar un modelo singénico *in vivo* en ratones inmunocompetentes. Además, las mutaciones presentes en esta línea celular, así como el patrón de expresión génica, son similares a las que se producen en un CCR humano espontáneo poco diferenciado, agresivo y refractario a terapias convencionales (Castle J.C. y col., 2014).

El estudio de la cinética de captación del FS por parte de células CT26 demostró que a las 6 h ingresa la máxima cantidad de Pc9 a la célula, y luego de ese tiempo se alcanza un *plateau* que se mantiene hasta las 24 h. Sobre la base de los resultados obtenidos decidimos continuar los experimentos con 24 h de incubación en la oscuridad con Pc9-T1107, para así alcanzar niveles máximos de incorporación del FS antes de la irradiación. La cinética descrita fue similar a la obtenida previamente en nuestro grupo de trabajo utilizando una Pc hidrofílica (Pc13) en células KB (Marino J. y col., 2010). En ese caso se observó que a las 4 h de incubación se alcanzó una captación máxima del FS, que se mantuvo hasta las 24 h. Por otro lado, definimos que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de Pc9-T1107 a la que fueron expuestas las células y el nivel de Pc9 incorporada. Las vías posibles de incorporación del FS a la célula comprenden endocitosis, transporte mediado por bombas de membrana y, en algunos pocos casos, difusión pasiva. Este último mecanismo se encuentra limitado a FSs sin carga o con un máximo de dos cargas, por lo que se podría hipotetizar que es una opción válida para Pc9. El predominio de una vía u otra depende de ciertas características del FS, como su lipofilicidad, su carga eléctrica y su grado de asimetría. Sin embargo, existe aún poca información que relacione el mecanismo de ingreso con la localización subcelular que alcanza el FS (Bacellar I.S.O. y col., 2015).

En forma análoga a lo descrito cuando Pc9 fue vehiculizada en liposomas (López Zeballos N.C. y col., 2013) o al realizar mediciones para Pc9-T1107 en medios fluidos (en ausencia de células) (García Vior M.C. y col., 2013), la formulación Pc9-T1107, luego de la irradiación, generó ROS en la línea CT26 en forma dependiente con la concentración de FS utilizada. Es interesante destacar que los niveles de ROS alcanzados luego de la fotoactivación de Pc9 resultaron ser similares independientemente del vehículo utilizado. Así, tanto en liposomas como en micelas se detectó una concordancia entre la concentración de FS empleada y el porcentaje de incremento de ROS. Si bien en el caso de Pc9-T1107 se determinaron los niveles de ROS por variadas metodologías (fluorometría, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo), una concentración de FS igual a $2 \times IC_{50}$ generó, en promedio, un aumento en los niveles de ROS de 2,3 veces. Resultados similares fueron obtenidos para las formulaciones liposoma-Pc9, en las cuales una concentración de Pc9 equivalente a $2 \times IC_{50}$ produjo incrementos de aproximadamente 2,5 veces en la proporción de ROS. En consecuencia, podemos concluir que los niveles de ROS dependieron principalmente de la relación entre la concentración de FS empleada y el valor de IC_{50} , y no de las características del vehículo que contiene Pc9. A su vez, una mayor producción de ROS se relaciona en forma cuantitativa con una mayor eficiencia fototóxica, como fuera ya sugerido por otros autores (Oliveira C.S. y col., 2011).

Mediante el uso de los antioxidantes TROLOX y N-acetil-L-cisteína se logró prevenir casi totalmente el daño citotóxico provocado por Pc9-T1107. En consecuencia, se verificó que las ROS poseen un rol preponderante en el mecanismo de muerte celular desencadenado por la TFD con Pc9-T1107. A diferencia de lo descrito por otros autores, la concentración de TROLOX necesaria para evitar el efecto fototóxico de Pc9-T1107 fue significativamente mayor (5 mM) a la utilizada en otros modelos. Existen reportes en los que se demuestra que una inhibición semejante del efecto de la TFD pudo ser alcanzada utilizando TROLOX en concentraciones 3 mM (Luo Y. y col., 1996) y 20 μ M (Juarez A.V. y col., 2015). Así, nuestros resultados sugieren que la formulación Pc9-T1107 generó una combinación y proporción de especies reactivas de oxígeno de mayor capacidad oxidativa, y por ende, más difíciles de contrarrestar mediante el uso de TROLOX.

En el área de la TFD existen opiniones diversas acerca de cuál debería ser la localización subcelular más conveniente de un FS para maximizar su eficacia. El desarrollo de FSs de localización nuclear ha sido un objetivo planteado por el grupo de trabajo de Wang S. y col. (2016). Ellos demostraron que la conjugación del FS verde de indocianina con un anticuerpo anti-Ki-67 (proteína nuclear involucrada en el proceso de proliferación celular) permite el direccionamiento del FS al núcleo y su posterior activación tras la iluminación. También ha sido reportada la eficacia fototóxica de una familia de porfirinas hidrofílicas de localización nuclear (Mion G. y col., 2015). A pesar de estos resultados, otros FSs que se dirigen al núcleo, como ciertos complejos de platino(II), demostraron ser tóxicos en la oscuridad (Srivastava P. y col., 2018). De este modo, y sobre la base del análisis de un mayor número de ejemplos informados en la literatura, es posible concluir que aún no se ha llegado a un consenso que permita definir la localización subcelular de elección para un FS. En nuestro caso particular, cuando investigamos la localización subcelular de Pc9, empleando la sonda Hoechst 33258 y microscopía confocal, demostramos una localización citosólica, pero no nuclear, una vez incorporada a las células CT26.

En este contexto, decidimos luego determinar las organelas que internalizaban Pc9. Al utilizar sondas fluorescentes organelo-específicas comprobamos que Pc9 colocalizó con lisosomas y retículo endoplásmico, pero no con mitocondrias. Si bien la localización intracelular puede variar según la línea celular o el FS en estudio, en nuestro caso se ha mantenido la ubicación lisosomal de Pc9 en las diferentes líneas celulares evaluadas (KB o CT26) y también en todos los vehículos seleccionados (liposomas S y S-PEG o la micela de poloxamina T1107). La localización subcelular preferencial en líneas de carcinoma de colon parece darse, hasta el momento, en lisosomas y/o mitocondrias para FSs de distinta naturaleza química, como derivados de clorinas, diarilporfirinas y 5-ALA (Krieg R.C. y col., 2003; Marchal S. y col., 2005; Gariboldi M.B. y col., 2009). Puesto que, como se ha planteado previamente, las organelas donde se ubica el FS antes de la irradiación resultan

los sitios donde se inicia el daño citotóxico (Buytaert E. y col., 2007; Oleinick N.L. y col., 2002; Chiu S.M. y col., 2010), decidimos luego investigar el rol de los lisosomas y el RE en el mecanismo de muerte celular inducido por Pc9-T1107.

Ha sido reportado que la peroxidación de lípidos de membrana producida por ROS puede alterar la integridad de la membrana lisosomal (Roberg K. y col., 1999; Kågedal K. y col., 2001; Repnik U. y col., 2012). Nuestros resultados con la sonda naranja de acridina han revelado que la TFD con Pc9-T1107 provoca una rápida permeabilización de la membrana lisosomal. La participación de las ROS en este proceso también fue demostrada mediante el empleo del antioxidante TROLOX, ya que en presencia del mismo se redujo significativamente la permeabilización. Estos primeros resultados fueron luego confirmados al detectarse un incremento en los niveles citosólicos de Cathepsina D, una enzima lisosomal implicada en la regulación de la respuesta apoptótica (Repnik U. y col., 2012; Guicciardi M.E. y col., 2004; Johansson A.C. y col., 2010; Boya P. y Kroemer G., 2008). Además, como consecuencia de la TFD, se produjo una disminución en la expresión de Hsp70, una proteína involucrada en el mantenimiento de la integridad de la membrana lisosomal (Nylandsted J. y col., 2004; Doulias P.T. y col., 2007; Petersen N.H. y col., 2010). Este rol de Hsp70 se ejerce a través de un mecanismo complejo que involucra a una serie de moléculas (Petersen N.H. y Kirkegaard T., 2010; Yan M. y col., 2016). La Hsp70, localizada en el citosol, se encuentra en condiciones normales unida a bismonoacilglicerofosfato, el cual a su vez interactúa con la esfingomielinasa ácida. Esta última puede entonces degradar esfingomielina generando ceramida, una molécula que al insertarse en las membranas lisosomales aumenta su estabilidad. En consecuencia, una disminución en los niveles de Hsp70 lleva a una disminución en la actividad de la esfingomielinasa ácida, con la consecuente reducción en la producción de ceramida para estabilizar la membrana lisosomal. Por otro lado, Hsp70 ha sido también identificado como un inhibidor de la vía intrínseca de la apoptosis (Jiang Z. y col., 2014; Almeida R.D. y col., 2004). A través de su unión al dominio de activación y reclutamiento de caspasas (CARD) del factor-1 activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1), Hsp70 impide el ensamblaje del apoptosoma. Por ende, se evita así el reclutamiento de procaspasa 9 para dar lugar a la caspasa iniciadora 9. De esta forma, es posible hipotetizar que la disminución observada en los niveles de Hsp70 podría facilitar la formación del apoptosoma con la consiguiente activación de procaspasa 9. Otros grupos también han descripto que la localización lisosomal de un FS puede producir la permeabilización de las membranas de estas organelas luego de la irradiación. Algunos de estos trabajos se centraron en ftalocianinas catiónicas de zinc(II) (Marino J. y col., 2013), formulaciones de clorina e6 (Reiners J.J.Jr. y col., 2002; Li H. y col., 2016) o el derivado de porfirina ATX-s10 (Ichinose S. y col., 2006).

Las enzimas lisosomales liberadas al citosol, como consecuencia de la permeabilización de la membrana lisosomal, son mediadoras de la apoptosis a través de la digestión de proteínas intracelulares (Repnik U. y col., 2012; Johansson A.C. y col., 2010; Boya P. y Kroemer G., 2008). En nuestro modelo, la contribución de enzimas lisosomales al proceso de muerte celular fue determinado evaluando el efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la viabilidad celular. De esta forma, demostramos la participación de Catepsina D, Catepsina B y diversas serin-proteasas en el mecanismo de muerte desencadenado por la TFD con Pc9-T1107. Los roles biológicos de estas endopeptidasas son variados. Así, la aspártico-proteasa Catepsina D ha sido identificada en ciertos modelos como responsable del clivaje de procaspasa 8 y de Bid para generar las formas pro-apoptóticas caspasa 8 y Bid truncado (tBid) (Conus S. y col., 2008; Stoka V. y col., 2011; Appelqvist H. y col., 2012). Por otro lado, se ha descrito que la cisteín-proteasa Catepsina B puede participar en la inactivación por clivaje de proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2 y Bcl-X_L, y al mismo tiempo puede promover la generación de tBid y la liberación de citocromo c desde las mitocondrias (Cirman T. y col., 2004; Droga-Mazovec G. y col., 2008; Aggarwal N. y Sloane B.F., 2014). Por su parte, dentro de las serin-proteasas resulta de particular interés la Catepsina A debido a su localización lisosomal. Esta endopeptidasa, al degradar a la proteína de membrana asociada a lisosomas tipo 2A (LAMP-2A), participa en la inhibición de la autofagia mediada por chaperonas (Kaminsky V. y Zhivotovsky B., 2012).

El RE es un orgánulo intracelular con un rol importante en la síntesis, el plegamiento y el tráfico de proteínas, y funciona además como un depósito o reservorio de calcio dentro de la célula (Almanza A. y col., 2018; Oakes S.A. y Papa F.R., 2015). El estrés de RE genera una acumulación de proteínas mal plegadas en la luz de esta organela y la liberación de calcio al citosol. Como respuesta, la activación de una UPR conlleva a disminuir la síntesis de proteínas y favorecer su plegamiento y degradación (Schröder M. y Kaufman R.J., 2005; Szegezdi E. y col., 2006). Si bien la UPR es un proceso tendiente a recuperar la homeostasis del RE, si el daño es demasiado grave o la UPR insuficiente, el estrés de RE puede tener como destino final la muerte de la célula. En nuestro modelo hemos encontrado que luego de la TFD con Pc9-T1107 los niveles de expresión de las chaperonas marcadoras de UPR, tales como GRP78/BIP, Calnexina, Hsp90 y Hsp110 se encontraron aumentados, en concordancia con algunos resultados presentados en la literatura (Almeida R.D. y col., 2004; Curry P.M. y Levy J.G., 1993; Buytaert E. y col., 2007; Jiang Z. y col., 2014). Diversos autores han demostrado que el estrés de RE produce la disociación de GRP78/BIP de los sensores de estrés del RE (IRE1, PERK y ATF6 α). Una vez libres, IRE1, PERK y ATF6 α pueden cumplir otras funciones (Luo K. y Cao S.S., 2015; Moserova I. y Kralova J., 2012). IRE1 favorece la generación del poro mitocondrial al unirse a Bak y Bax, al mismo tiempo que promueve la degradación de ARNm codificante para proteínas de

sobrevida, en un proceso denominado RIDD (del inglés *regulated IRE1-dependent decay of mRNA*) (Hetz C., 2012; Cao S.S. y Kaufman R.J., 2012). PERK, por su parte, inicia la activación de una compleja cascada de efectores, entre los que se encuentran eIF2 α , ATF4, CHOP y ERO1 α . En conjunto, se promueve la generación de ROS, la liberación de calcio del RE, la inhibición de Bcl-2, la transcripción de Bim y la activación de DR5 independiente de ligando (Lu M. y col., 2014; Tabas I. y Ron D., 2011). Finalmente, ATF6 α favorece que el RE continúe con su normal funcionamiento intentando superar la injuria. Una vez disociado de GRP78/BIP, ATF6 α se relocaliza en el aparato de Golgi donde luego de dos procesos de clivaje se genera un fragmento de 50 kDa que es incorporado en el núcleo celular. Allí, participa de la transcripción de genes correspondientes a chaperonas (GRP78/BIP), componentes de la maquinaria de degradación de proteínas asociadas al RE (ERAD, del inglés *ER-associated protein degradation*) e induce la biogénesis de RE. En conjunto, ATF6 α favorece el plegamiento y secreción de proteínas.

La disminución observada en la liberación de Ca⁺² al citosol, luego de la TFD de células incubadas en presencia del antioxidante TROLOX, sugirió un rol de las ROS en la alteración de la homeostasis del RE. Al respecto, ha sido reportado que el daño foto-oxidativo de la bomba Ca⁺²-ATPasa-2 (SERCA2), una enzima responsable del transporte activo de calcio desde el citosol hacia el RE, aumenta las concentraciones de Ca⁺² en el citosol (Buytaert E. y col., 2007; Buytaert E. y col., 2006). En nuestro modelo, hemos también demostrado que niveles aumentados de Ca⁺² intracelular contribuyeron al proceso de muerte, ya que la pre-incubación de células CT26 con el quelante de Ca⁺² BAPTA-AM provocó una menor disminución de la viabilidad celular luego de la TFD. Un mecanismo de muerte asociado a la alteración en los niveles de Ca⁺² citoplasmático ha sido descripto para otros FSs localizados en RE. Algunos ejemplos de estos FSs son la hipericina (Buytaert E. y col., 2006) y ciertos derivados de porfirinas (Mosserova I. y Kralova J., 2012). Diversos eventos serían responsables de mediar el proceso de muerte relacionado con la liberación citosólica de Ca⁺². Se ha demostrado que la captación de Ca⁺² por parte de las mitocondrias genera un aumento en la permeabilización de la membrana mitocondrial interna, produciendo la liberación al citosol de factores apoptogénicos (Orrenius S. y col., 2003). Por otro lado, el efecto del calcio sobre la mitocondria también podría estar mediado por el rol de cofactor que este catión ejerce sobre la fosfolipasa A2 dependiente de calcio (cPLA2). El aumento en la actividad de esta proteína tiene como consecuencia el incremento en los niveles de ácido araquidónico, molécula involucrada en la formación del poro mitocondrial (Gugliucci A. y col., 2002; Hendrickx N. y col., 2005).

Una serie de resultados experimentales sugerían que la mitocondria se debía ver afectada por la TFD, con la consiguiente formación de poros mitocondriales a través de los cuales se liberan al citosol factores apoptogénicos. Entre ellos podemos mencionar la

liberación de Catepsinas lisosomales, el estrés del RE (que como se explicó produce la activación de IRE1) y el aumento en los niveles citosólicos de Ca^{+2} . Si bien en ausencia de irradiación Pc9 no se localizó en mitocondrias, no se debe descartar la posibilidad de que luego de ser excitada, Pc9 se reubique en esta organela. Diversos autores han planteado que una vez producida la iluminación del FS, el mismo puede alcanzar otras organelas para producir ROS (Kessel D., 2004; Rosenkranz A.A. y col., 2000). Este fenómeno es particularmente usual para FSs que se localizan en lisosomas (Bacellar I.S.O. y col., 2015; Kessel D., 2003). La confirmación de que el potencial de membrana mitocondrial se encontraba disminuido, como consecuencia del desbalance iónico provocado por la formación del poro mitocondrial, permitió concluir que se estaban liberando, desde esta organela al citosol, importantes moléculas implicadas en la vía intrínseca de la apoptosis. También se asoció con el daño mitocondrial la disminución en los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L, así como la menor expresión de Bid, aumentando entonces la cantidad del fragmento pro-apoptótico tBid. Por otro lado, los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax se vieron disminuidos. Si bien este resultado no sugiere, en principio, un aporte al desbalance en la relación entre proteínas anti y pro-apoptóticas hacia la apoptosis, se debería tener en cuenta la posible contribución de otras proteínas pro-apoptóticas (Bad, Bak, PUMA, Noxa). Asimismo, se debe considerar la posibilidad de que Bax se esté clivando para generar un fragmento de 18 kDa (p18 Bax) con mayor capacidad apoptótica (Toyota H. y col., 2003), el cual no puede ser detectado con el anticuerpo utilizado. La formación de p18 Bax a partir de Bax *wild type* se ha reportado a partir de estímulos como el IFN- α (Yanase N. y col., 1998) y algunos quimioterápicos (Wood D.E. y col., 1998), y las calpaínas han sido señaladas como las principales proteínas responsables de este proceso (Wood D.E. y col., 1998).

Las calpaínas son un grupo de cisteín-proteasas, dependientes de calcio, activadas durante el estrés de RE (Dougherty T.J. y col., 1998; Moserova I. y Kralova J., 2012). El aumento en los niveles de calcio obtenido luego de la TFD con Pc9-T1107 sugirió que la actividad de estas proteínas podría estar aumentada. Se ha descrito que las calpaínas poseen funciones biológicas similares a las de ciertas caspasas y que tienen la capacidad de clivar proteínas de la familia Bcl-2 (Buytaert E. y col., 2007; Almeida R.D. y col., 2004; Oleinick N.L. y col., 2002). También se ha informado que pueden clivar LAMP-2A y Hsp70 (Petersen N.H. y Kirkegaard T., 2010). Teniendo en cuenta que Hsp70 disminuyó luego de la TFD con Pc9-T1107 y que la inhibición de las calpaínas impidió el daño citotóxico, es posible sugerir que las calpaínas median el clivaje de Hsp70, participando entonces en la permeabilización de la membrana lisosomal. Además, la casi completa recuperación en la expresión de Bax obtenida en presencia de PD 150606 indicó la participación de las calpaínas en el fotodaño sufrido por Bax. Si bien hasta el momento no había sido reportado

el clivaje de Bax por calpains luego de TFD, es posible proponer que la proteólisis de Bax origine un fragmento más pro-apoptótico, de acuerdo a lo descrito en otros sistemas (Toyota H. y col., 2003). Aún así, no es posible descartar que el clivaje de Bax debido a calpains produzca una forma inactiva de la proteína, y en ese caso, el proceso apoptótico estaría principalmente mediado por la disminución de las proteínas anti-apoptóticas junto con la participación de otras proteínas pro-apoptóticas.

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por una serie de eventos a nivel molecular, entre los que se pueden mencionar la activación de las caspasas iniciadoras 8 (típica de la vía extrínseca) y 9 (típica de la vía intrínseca), y de la caspasa ejecutora 3 (Kaufmann S.H. y Hengartner M.O., 2001; Hengartner M.O., 2000; Galluzzi L. y col., 2018). Esta última es una cisteín-proteasa que puede ser activada por las caspasas 8 y 9 para clivar una serie de sustratos responsables de las alteraciones típicas que ocurren durante la apoptosis (Grutter M.G., 2000; Danial N.N. y Korsmeyer S.J., 2004). La muerte celular desencadenada por la TFD con Pc9-T1107 demostró estar mediada por caspasa 3, la cual fue activada inicialmente por la caspasa 8 (a partir de 1 h p.i.) y posteriormente por la vía caspasa 9 (a partir de las 3 h p.i.). La participación de caspasa 8 en el mecanismo de muerte de Pc9-T1107 había sido sugerida por resultados previos, como el clivaje de Bid, un proceso que se conoce se encuentra mediado por caspasa 8 (Buytaert E. y col., 2007). En cuanto a la caspasa 9, ésta se activa a partir de la formación del apoptosoma. Este complejo heptamérico logra ensamblarse gracias a la liberación de la mitocondria de factores apoptogénicos, como el citocromo c. Hemos demostrado que la TFD favorece la salida de este tipo de moléculas, por cuanto induce la despolarización de la membrana mitocondrial; disminuye los niveles de Bid, Bcl-2 y Bcl-X_L; aumenta el calcio intracelular; incrementa la actividad de Catepsina B; y promueve el estrés de RE. La disminución en los niveles de Hsp70 y procaspasa 12 también podrían propiciar la activación de la vía intrínseca. Mientras que la primera, como se comentó anteriormente, es una proteína inhibidora de la formación del apoptosoma, la segunda, una vez activa, puede clivar a la procaspasa 9 para dar lugar a la caspasa 9 activa. También demostramos que el clivaje de procaspasa 12 se debe a la acción de las calpains, las cuales ejercerían este efecto una vez liberadas de su inhibidor, la calpastatina (Orrenius S. y col., 2003). Algunos trabajos han revelado que células deficientes en caspasa 12 son más resistentes a la apoptosis inducida por un estímulo que provoca estrés del RE (Nakagawa T. y col., 2000).

Por otro lado, ha sido descrito que Catepsina D puede participar en procesos de muerte mediando la activación de procaspasa 8 (Conus S. y col., 2008; Marino J. y col., 2013) y el clivaje de Bid para generar tBid (Stoka V. y col., 2011; Reiners J.J.Jr. y col., 2002; Droga-Mazovec G. y col., 2008; Appelqvist H. y col., 2012), un fragmento de Bid pro-apoptótico implicado en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. En la línea CT26

demostramos que Catepsina D es una proteasa que participa en el clivaje de procaspasa 8, la cual entonces podría activarse en forma independiente a la unión de ligandos de receptores de muerte. Aún así, no se han realizado ensayos que permitan descartar la participación de estas proteínas de membrana. Se evidenció que Catepsina D también promueve en este sistema el clivaje de Bid, si bien esto no implica que lo haga en forma directa, ya que no se puede excluir la posibilidad de que el clivaje de Bid se deba en última instancia a la acción de la caspasa 8 (Li H. y col., 1998; Luo X. y col., 1998).

El mecanismo de muerte por apoptosis se diferencia de otros procesos de muerte por ciertos rasgos característicos, como disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y clivaje del ADN cromosomal (García de la Cadena S. y Massieu L., 2016; Buytaert E. y col., 2007). Cada una de estas características fue observada en nuestro modelo utilizando microscopía óptica, microscopía de fluorescencia con la sonda Hoechst 33258 y citometría de flujo con ioduro de propidio, respectivamente. También confirmamos que el proceso de muerte desencadenado por Pc9-T1107 fue de tipo apoptótico a través del clivaje de PARP-1 y la aparición de su fragmento característico de 89 kDa. Las formas clivadas son incapaces de llevar adelante la función de PARP-1, relativa a la reparación del ADN nuclear mediante la síntesis de poli-ADP-ribosa (Aredia F. y Scovassi A.I., 2014). El clivaje de PARP-1, con la consiguiente aparición de su fragmento de 89 kDa, representa uno de los llamados eventos característicos (o *hallmarks*) de la apoptosis (Yang Y. y col., 2004; Chaitanya G.V. y col., 2010). Un mecanismo de muerte celular apoptótica también ha sido descrito para otros FSs vehiculizados en micelas poliméricas. Por ejemplo, se ha reportado la capacidad de una Pc de zinc(II) vehiculizada en micelas de desencadenar apoptosis en células metastásicas de melanoma (Lamch L. y col., 2016). El Photofrin®, una porfirina encapsulada en micelas de tipo Pluronic®, también induce una respuesta apoptótica en líneas celulares de carcinoma de mama y ovario (Lamch L. y col., 2014).

Ha sido previamente reportado que ciertos FSs provocan una reducción en la proliferación celular debido a la combinación entre una respuesta apoptótica y arresto del ciclo. Cómo se altera la proporción de células en cada fase del ciclo depende de la naturaleza química del FS y de la línea celular usada. Un ejemplo de FS que presenta concomitantemente efecto apoptótico y arresto del ciclo celular es una ftalocianina de zinc tetrasustituída con trietilenexisulfonilos. Al emplearse en el marco de TFD para células de cáncer gastrointestinal produjo arresto del ciclo en la fase G₁ (Kuzyniak W. y col., 2016). Por su parte, un derivado de fenilporfirina generó arresto en la fase S en células de carcinoma de pulmón (Liu J. y col., 2015; Wang H. y col., 2015), mientras que la TFD con Pc9-T1107 provocó una proporción aumentada de células CT26 en fase G₂/M y prolongación de la fase S, probando así que el daño fototóxico inhibe la proliferación celular no sólo mediando una respuesta apoptótica.

La autofagia es un proceso tendiente a mantener la homeostasis celular mediante el reciclado de componentes intracelulares, como proteínas mal plegadas, agregados proteicos, organelas dañadas, etc. (Ndoye A. y Weeraratna A.T., 2016; Dokladny K. y col., 2015). También, durante años, ha sido considerado un mecanismo de muerte. Este rol dual de la autofagia se ha planteado incluso en TFD, donde se sostiene que la misma puede ser una vía que se activa en las células para sobrevivir al fotodaño o bien un mecanismo de muerte si la injuria es muy grave (Buytaert E. y col., 2007). En presencia de inhibidores de autofagia, demostramos que la macroautofagia es un mecanismo tendiente a estimular la sobrevivencia celular una vez efectuada la TFD. Otros grupos de trabajo también han identificado que la inhibición de la autofagia puede resultar una estrategia de interés para potenciar la TFD. En un modelo de CCR, se ha reportado que el uso de inhibidores farmacológicos de autofagia y el silenciamiento de ATG5 (proteína involucrada en la elongación del fagóforo) provocaron un aumento en la apoptosis de cultivos bidimensionales expuestos a TFD con Protoporfirina IX (Wei M. y col., 2014). Además, se redujo la capacidad de estas células para formar colonosferas y para proliferar en un modelo *in vivo* xenográfico. En otro trabajo se ha reportado que la inhibición de la autofagia con 3-MA y CQ promueve la apoptosis y la sensibilidad de células de osteosarcoma humano a la TFD con el FS aloe-emodina (Tu P. y col., 2016).

A la luz de otros resultados, se podría hipotetizar también que se desencadena autofagia mediada por chaperonas. Esta idea surge del análisis del ensayo realizado con aprotinina (Figura 4.15c), un inhibidor de serin-proteasas como la Catepsina A. En el mismo, concluimos que la inhibición de serin-proteasas provocaba una disminución en el daño fototóxico. La Catepsina A está involucrada en procesos de inhibición de la autofagia ya que degrada a LAMP-2A (Kaminsky V. y Zhivotovsky B., 2012), proteína que participa del proceso de autofagia mediada por chaperonas. Su rol consiste en unir a la membrana lisosomal aquellas proteínas (muchas veces oxidadas) que serán degradadas. Consecuentemente, podemos sugerir que el uso de inhibidores de serin-proteasas produjo en nuestro modelo una desinhibición de la autofagia mediada por chaperonas y en consecuencia una exacerbación en su función de promover la sobrevivencia celular. De la misma forma, la prevención en la muerte celular post-TFD que provoca la pre-incubación con PD 150606 se podría explicar parcialmente debido a la capacidad de este inhibidor de evitar que las calpaínas cliven a LAMP-2A, por lo que mayores niveles de esta proteína promueven la autofagia y por ende la sobrevivencia (Petersen N.H. y Kirkegaard T., 2010).

En resumen, hemos logrado delinear las señales y eventos moleculares que producen un mecanismo de muerte apoptótico en cultivos bidimensionales de células CT26 luego de la aplicación de TFD con Pc9-T1107 (Figura 4.34). La generación de ROS en lisosomas y RE, las principales organelas donde Pc9 se localiza intracelularmente, promueven la activación

de un grupo de blancos moleculares. La permeabilización de la membrana lisosomal produjo la liberación de una serie de proteasas al citosol, contribuyendo éstas al clivaje de Bid y a la activación de caspasa 8. La fotoactivación de Pc9 en el RE activó una UPR e incrementó los niveles de calcio, favoreciendo la activación de calpaínas. La participación de la vía de apoptosis mitocondrial fue evidenciada por la reducción en el potencial de membrana de esta organela, la disminución en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 y la activación de caspasa 9. La consiguiente activación de caspasa 3 provocó el clivaje de PARP-1 y el desenlace apoptótico. En paralelo, la TFD promovió alteraciones del ciclo celular, mediante arresto en la fase G₂/M y prolongación de la fase S, así como la activación de una respuesta macroautofágica tendiente a contrarrestar el efecto citotóxico de Pc9-T1107.

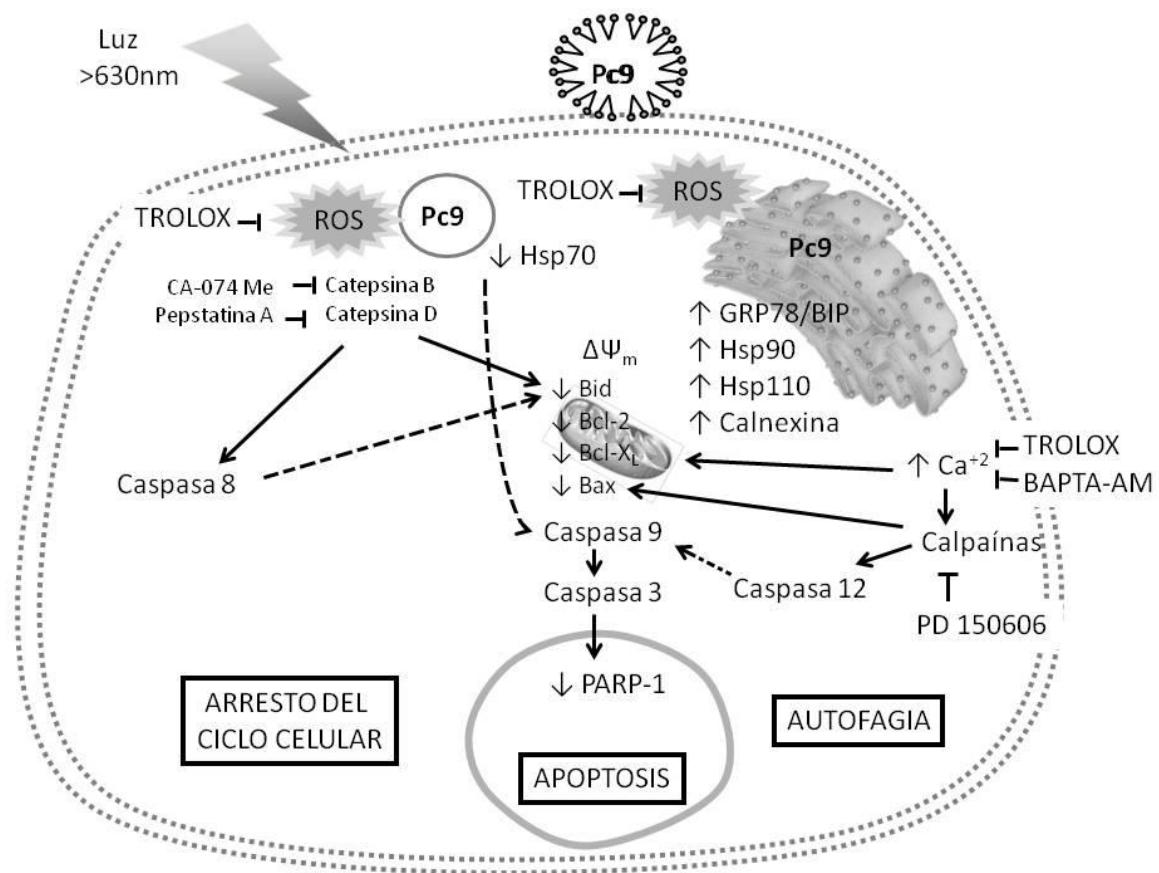


Figura 4.34. Modelo propuesto de muerte celular producida por Pc9-T1107 en células CT26. La generación de ROS en lisosomas y RE inducida luego de la TFD con Pc9-T1107 produce la permeabilización de las membranas lisosomales, estrés de RE y activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Las líneas sólidas representan señales intracelulares que hemos demostrado experimentalmente están involucradas en una muerte apoptótica, mientras que las líneas punteadas señalan interacciones reportadas en bibliografía.

Capítulo 5

**.Efecto de Pc9-T1107 en cultivos
celulares tridimensionales y en un
modelo *in vivo* de carcinoma de colon**

5.1. Efecto de Pc9-T1107 en cultivos celulares tridimensionales.

Los cultivos celulares bidimensionales han sido durante mucho tiempo uno de los modelos más empleados para experimentación preclínica. Esto es debido a su fácil accesibilidad, costos relativamente bajos y al gran número de protocolos experimentales disponibles. Aún así, este sistema de estudio cuenta con serias limitaciones que dificultan la obtención de resultados equiparables en sistemas más complejos, entre las cuales se pueden mencionar la falta de arquitectura y funcionalidad tisular, y el alcance restringido de las interpretaciones en cuanto a su relevancia fisiológica. Para sortear estas dificultades se han desarrollado modelos más complejos que se asemejan en mayor medida a lo que realmente ocurre en las patologías estudiadas. En nuestro caso, decidimos evaluar, en una primer etapa, la efectividad de la TFD con Pc9-T1107 en cultivos tridimensionales que, a diferencia de los bidimensionales, reproducen mejor la complejidad estructural tumoral por presentar gradientes de llegada de nutrientes, oxígeno y FS a las células tumorales.

5.1.1. Citotoxicidad y potencia de Pc9-T1107.

Con el objetivo de determinar el efecto de la TFD con Pc9-T1107 en modelos 3D, se realizaron curvas dosis-respuesta de viabilidad celular tanto en la oscuridad como 24 h luego de una irradiación de $2,8 \text{ J.cm}^{-2}$.

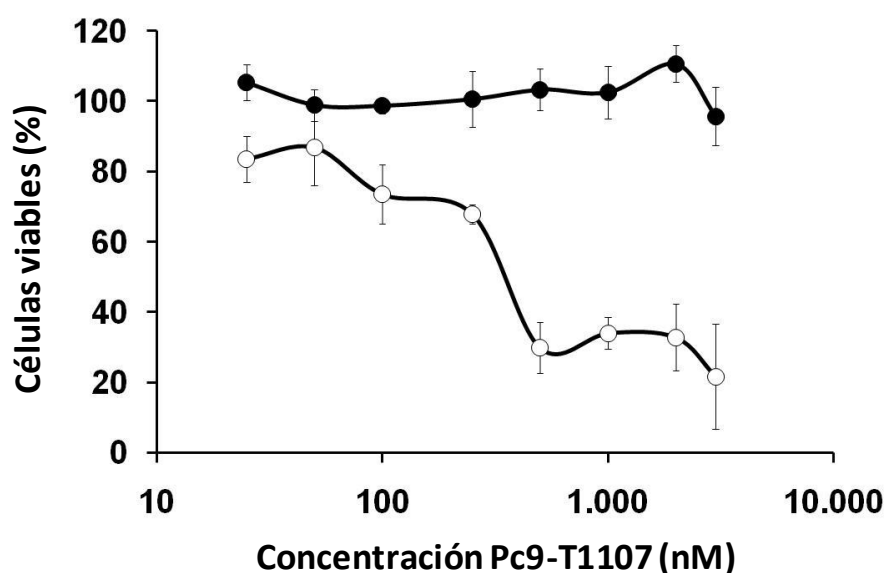


Figura 5.1. Efecto de la incubación con Pc9-T1107 sobre la viabilidad de cultivos tridimensionales de células CT26. Esferoides de células CT26 fueron incubados durante 24 h con diferentes concentraciones de Pc9-T1107. La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico de MTT, 24 h después de realizada la irradiación (○). Como control, las células se analizaron también en la oscuridad (●). Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 5.1, la viabilidad celular no se modificó en la oscuridad. En cambio, cuando los esferoides de células CT26 fueron irradiados, se notó una disminución en la viabilidad dependiente de la concentración utilizada de Pc9-T1107. El valor de IC_{50} calculado fue de 370 ± 11 nM, 37 veces mayor al obtenido en cultivos bidimensionales.

5.1.2. Alteraciones en el volumen del esferoide.

Un parámetro frecuentemente empleado como indicador de viabilidad celular en cultivos tridimensionales es el volumen del esferoide (Charoen K.M. y col., 2014; Liu J. y col., 2017). A partir de las imágenes obtenidas de los cultivos 3D, mediante el software ImageJ se estimó este parámetro en esferoides control y esferoides expuestos a TFD con Pc9-T1107.

Como se muestra en la Figura 5.2A, a partir del día 2 post-irradiación el tamaño de los esferoides tratados es significativamente menor al de los controles. A partir del día 8 p.i. comenzó a observarse también una diferencia entre el volumen de los esferoides incubados con Pc9-T1107 en una concentración 370 nM (IC_{50}) y aquellos incubados con una concentración correspondiente a $5 \times IC_{50}$. Como era de esperar, el tamaño del esferoide fue menor cuanto mayor fue la concentración evaluada de Pc9-T1107. En el día 15 p.i., mientras que los esferoides control habían triplicado su volumen con respecto al día de la irradiación, aquellos tratados con una cantidad equivalente a la IC_{50} sólo lo habían duplicado, y aquellos tratados con $5 \times IC_{50}$ crecieron sólo un 50%.

En la Figura 5.2B se presentan fotografías de campo claro a modo de ejemplo de las que fueron utilizadas para medir el diámetro de los esferoides y, posteriormente, calcular su volumen. Mientras que el día de la irradiación (día 0 p.i.) los esferoides poseían un volumen similar bajo todas las condiciones experimentales (Figura 5.2A), 15 días después de la iluminación se confirmaron diferencias notables entre los distintos grupos (Figuras 5.2A y B).

Cabe resaltar que aunque no se observan diferencias de tamaño entre esferoides incubados con distintas concentraciones de Pc9-T1107 luego de 24 h p.i. (Figura 5.2A), la viabilidad celular, determinada por la reducción de la sal de tetrazolio MTT, se modificó considerablemente para este tiempo en forma dependiente de la concentración. Así, como

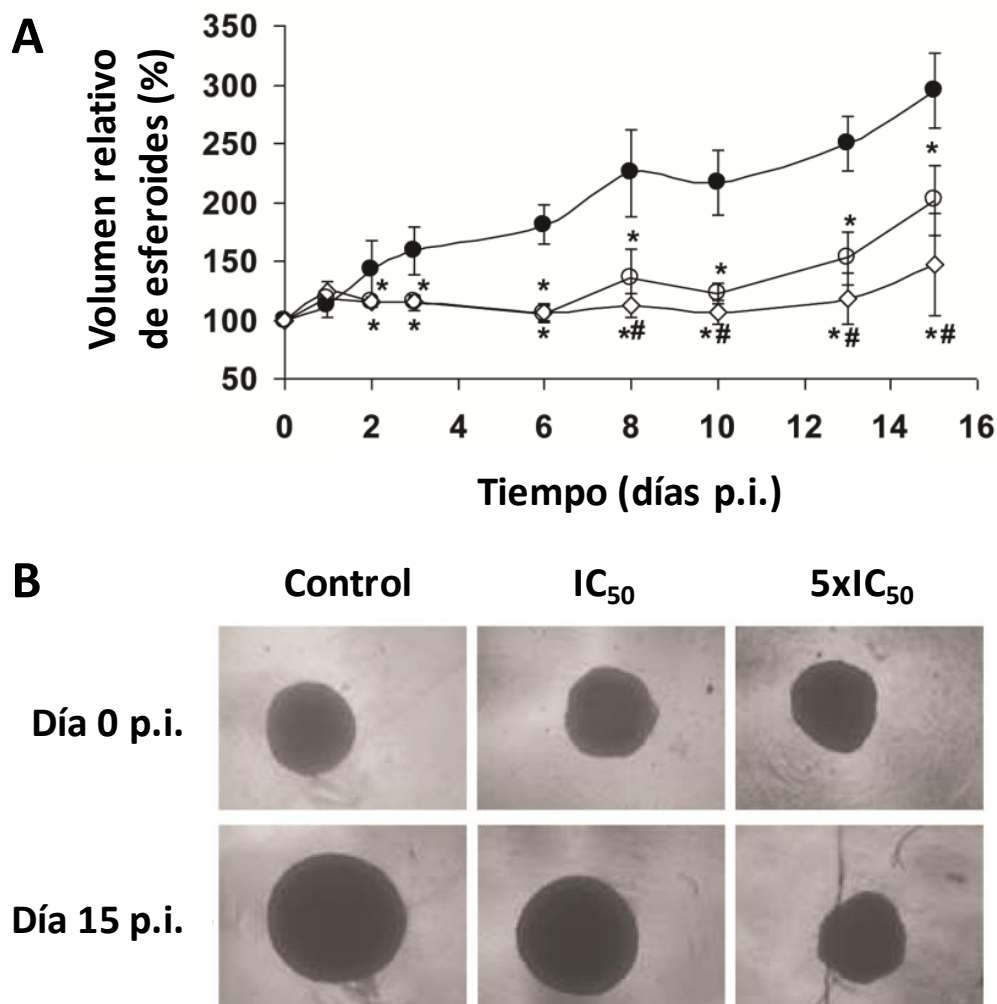


Figura 5.2. Efecto de Pc9-T1107 sobre el volumen de cultivos tridimensionales de células CT26. (A) Esferoides de células CT26 fueron incubados durante 24 h con diferentes concentraciones de Pc9-T1107. Luego de la irradiación, se tomaron fotografías de los esferoides a distintos tiempos p.i. y se estimó el volumen del esferoide utilizando el software ImageJ. Las curvas corresponden a cinéticas de crecimiento de esferoides incubados en ausencia de Pc9-T1107 (●) o en presencia de concentraciones correspondientes al valor de IC₅₀ (○) o 5xIC₅₀ (◇). Los resultados están expresados como la media ± ES de al menos tres experimentos independientes, con respecto al volumen del esferoide el día de la irradiación. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni. *p<0,05 significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107. #p<0,05 significativamente distinto de células tratadas con la IC₅₀ de Pc9-T1107. (B) Fotografías de campo claro correspondientes a esferoides incubados en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de Pc9-T1107 antes de la irradiación o 15 días después. Aumento: 40X.

se muestra en la Figura 5.1, la viabilidad disminuyó a un 50% en células tratadas con una concentración IC₅₀ de FS, y a un 33% en células tratadas con 5xIC₅₀. De esta forma, considerando que el esferoide puede estar formado tanto por células viables como por

células no viables que aún no se han desprendido, nuestros resultados indican que el volumen del esferoide constituye más bien un indicador relativo de la viabilidad celular.

5.1.3. Inducción de una respuesta apoptótica.

Una vez demostrada la eficacia de la TFD con Pc9-T1107 en cultivos tridimensionales, decidimos investigar si en este modelo también se producía una respuesta apoptótica. Para ello, los cultivos de esferoides se tiñeron con Hoechst 33258 y los niveles de procaspasa 3 se cuantificaron mediante ensayos de WB.

5.1.3.1. Alteraciones en la morfología nuclear.

Para evaluar posibles cambios o modificaciones en la morfología nuclear producidos por la TFD con Pc9-T1107 se procedió a obtener imágenes de microscopía confocal luego de incubar cultivos tridimensionales de células CT26 con Hoechst 33258.

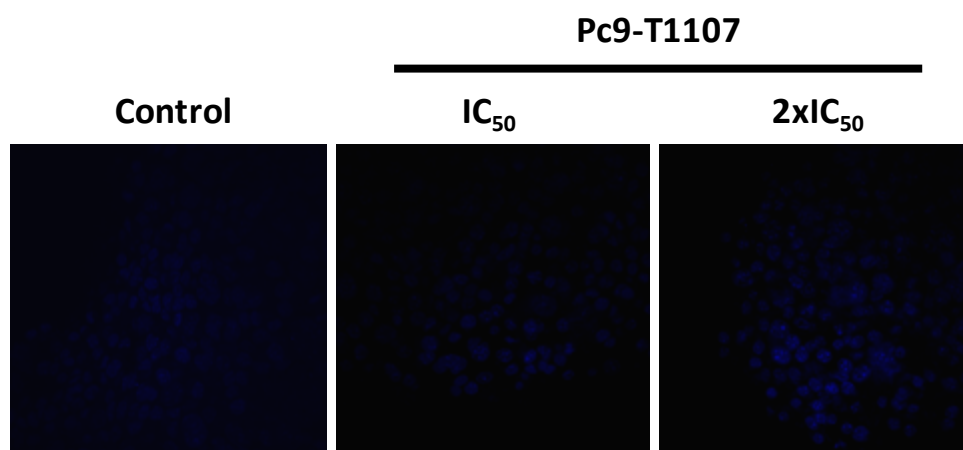


Figura 5.3. Efecto de Pc9-T1107 sobre la morfología nuclear en cultivos tridimensionales de células CT26. Esferoides de células CT26 crecidos sobre cubreobjetos fueron expuestos durante 24 h a distintas concentraciones de Pc9-T1107. 24 h después de finalizada la irradiación, las células fueron fijadas e incubadas con Hoechst 33258 (2 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Los núcleos fueron inspeccionados mediante microscopía confocal de fluorescencia. Aumento: 600X.

Como se observa en la Figura 5.3, la presencia de núcleos picnóticos característicos de procesos apoptóticos se hizo más evidente cuando las células fueron tratadas con Pc9-T1107 en una concentración 740 nM (2xIC₅₀).

5.1.3.2. Efecto sobre los niveles de procaspasa 3.

A continuación, decidimos determinar si los niveles de la caspasa 3, ejecutora de la apoptosis, estaban aumentados luego del tratamiento fotodinámico de los cultivos 3D con Pc9-T1107. Para ello, los esferoides se lisaron y se analizaron por ensayos de WB con un

anticuerpo anti-procaspasa 3. Esta proforma de caspasa da lugar mediante su clivaje a la caspasa 3 activa.

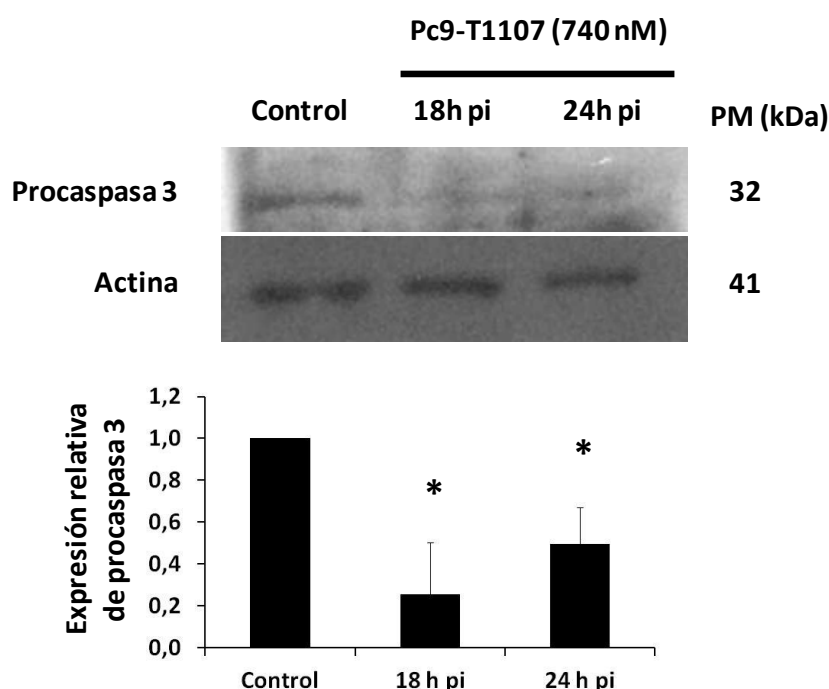


Figura 5.4. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles de procaspasa 3 en cultivos tridimensionales de células CT26. Esferoides de células CT26 expuestos a una concentración 740 nM de Pc9-T1107 fueron irradiados e incubados durante distintos tiempos. Los lisados celulares fueron sometidos a WB utilizando un anticuerpo específico para procaspasa 3. En el panel superior se presenta un experimento representativo, mientras que en el inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. Los resultados están expresados como la media \pm ES. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de células incubadas en ausencia de Pc9-T1107.

Como se muestra en la Figura 5.4, los niveles de procaspasa 3 se vieron reducidos a diferentes tiempos post-irradiación con respecto al nivel encontrado en los esferoides control. Así, el tratamiento de los esferoides con una concentración 740 nM de Pc9-T1107 ($2 \times IC_{50}$) produjo una reducción en los niveles de expresión de procaspasa 3 de aproximadamente 75 y 50% a las 18 y 24 h p.i. respectivamente, sugiriendo que luego de la TFD se favoreció el clivaje de la proforma dando lugar al fragmento activo.

5.2. Efecto de Pc9-T1107 en un modelo *in vivo* de carcinoma de colon.

5.2.1. Incorporación de Pc9 en el tumor.

Para evaluar el tiempo de retención de la formulación Pc9-T1107 en los tumores, una vez que los mismos alcanzaron un tamaño de 5 x 5 mm (ver protocolo detallado en el capítulo

Materiales y Métodos, sección 2.2.3.2), se administraron por vía intratumoral 100 μ l de una solución 10 μ M de Pc9-T1107 o bien el mismo volumen de solución fisiológica. A las 24 h post-inyección, los ratones Balb/c fueron anestesiados y la fluorescencia característica de Pc9 fue monitoreada mediante un equipo de toma de imágenes Bruker Xtreme I (Billerica, MA, EEUU). Los animales fueron posteriormente sacrificados, sus tumores extraídos y analizados en el mismo equipo en forma aislada.

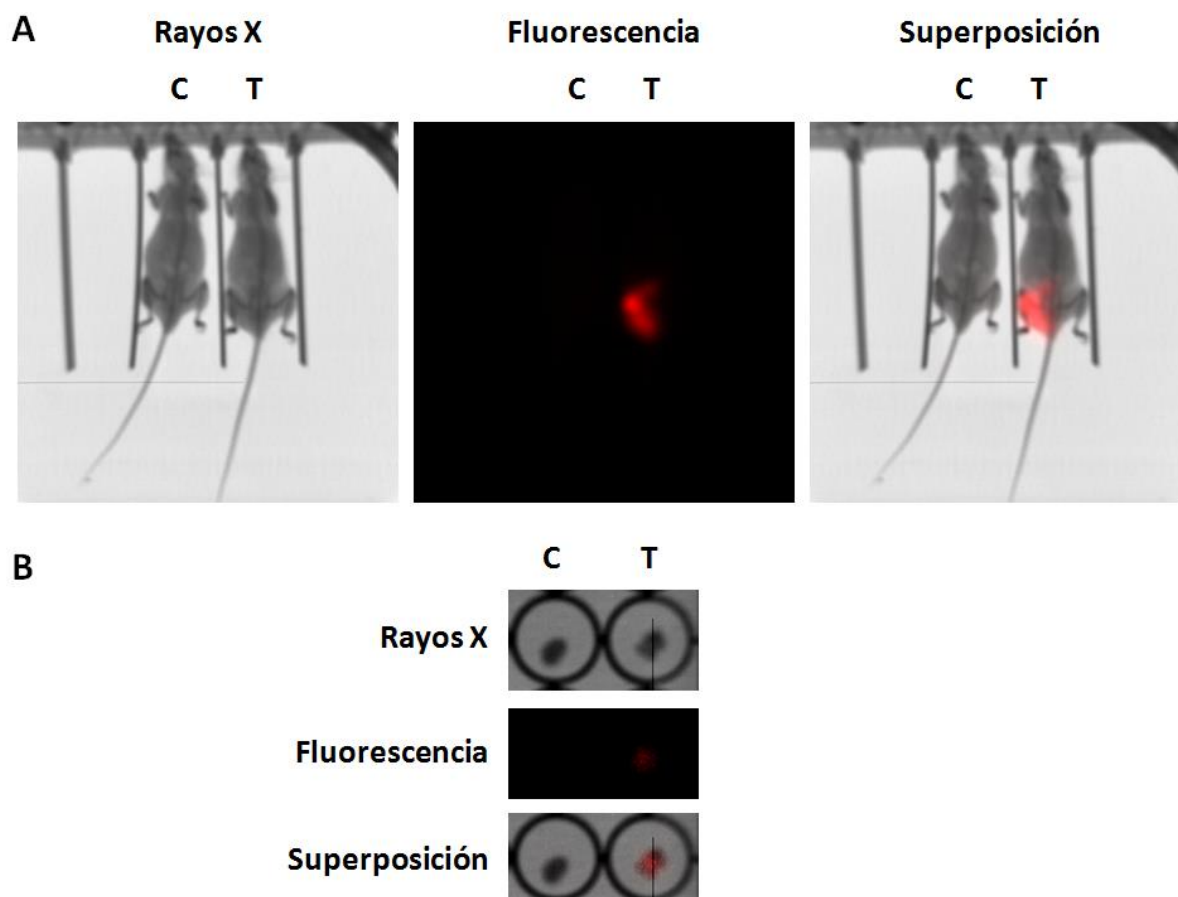


Figura 5.5. Localización de Pc9 en ratones Balb/c. (A) 24 h luego de la administración intratumoral de solución fisiológica (C) o Pc9-T1107 (T), los ratones Balb/c fueron anestesiados y examinados en un equipo de toma de imágenes Bruker Xtreme I. La longitud de onda de excitación fue de 690 nm y la de emisión 750 nm. (B) Al mismo tiempo post-inyección, los tumores extraídos de los animales fueron inspeccionados de forma análoga. Las imágenes de fluorescencia fueron acompañadas por fotografías de Rayos X.

Como se observa en la Figura 5.5A, luego de 24 h de realizada la inyección de Pc9-T1107, se obtuvo una emisión marcada correspondiente al FS localizado en la zona tumoral. El animal control, por el contrario, no presentó ningún tipo de señal fluorescente. Similares resultados se obtuvieron cuando se evaluó la emisión de fluorescencia de tumores extraídos de ratones controles y tratados (Figura 5.5B).

A continuación, los mismos tumores fueron fijados y cortados para ser analizados mediante microscopía confocal.

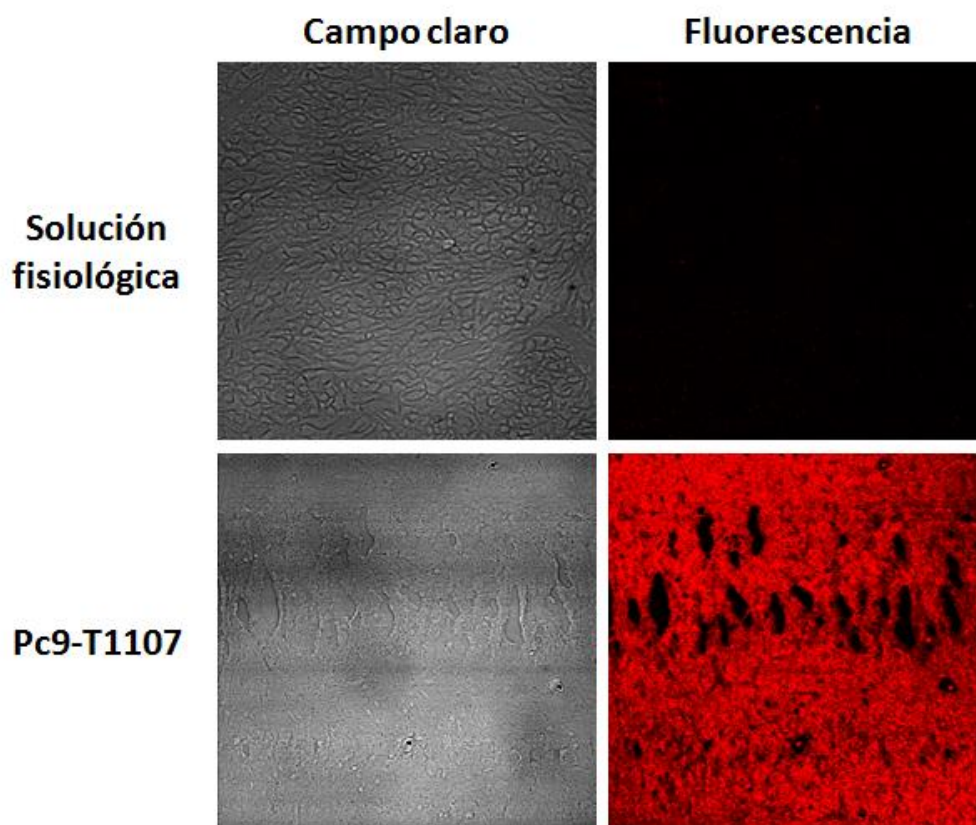


Figura 5.6. Incorporación de Pc9 al tumor. Luego de 24 h de la administración intratumoral de solución fisiológica o Pc9-T1107, los ratones fueron sacrificados y sus tumores extraídos. La señal fluorescente correspondiente a Pc9 se evaluó mediante microscopía confocal en cortes de tejido tumoral. Aumento: 400X.

Como se muestra en la Figura 5.6, la autofluorescencia propia de tumores control inyectados con solución fisiológica fue casi nula. En cambio, 24 h luego de la administración de Pc9-T1107 se observó una potente emisión roja característica del FS, indicando que el mismo se encuentra ampliamente retenido dentro de la masa tumoral.

En su conjunto, estos resultados permitieron concluir que 24 h resultaba una buena elección como intervalo entre la administración de Pc9-T1107 y la irradiación de los tumores, ya que luego de este tiempo el FS se encontraba dentro del tumor y no había sido aún eliminado en cantidades importantes.

5.2.2. Efecto antitumoral *in vivo* de Pc9-T1107.

Posteriormente, se procedió a determinar si la TFD con Pc9-T1107 resultaba efectiva en modelos *in vivo*. Para ello se utilizaron 4 grupos experimentales de ratones Balb/c machos

(ver Tabla 2.3 en Materiales y Métodos). El grupo I consistió en ratones inyectados con solución fisiológica que no fueron irradiados. En el grupo II se determinó si la irradiación *per se* generaba alguna alteración en el volumen tumoral. Estos ratones fueron irradiados 24 h después de la administración de solución fisiológica. Con el fin de investigar si Pc9-T1107 era tóxica en la oscuridad, los animales del grupo III fueron inyectados con Pc9-T1107 pero no fueron irradiados. Por último, para evaluar la eficacia de la TFD, los ratones del grupo IV fueron inyectados con la formulación y posteriormente irradiados.

5.2.2.1. Inhibición del crecimiento tumoral.

Tal como se describió en Materiales y Métodos (Figura 2.5), luego de una semana de adaptación los ratones Balb/c fueron inyectados en forma subcutánea con las células CT26. Una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente un tamaño de 5 x 5 mm, los animales fueron distribuidos en los cuatro grupos previamente mencionados. A partir del momento de la irradiación (día 19), el volumen tumoral fue monitoreado con el uso de un calibre.

En la Figura 5.7 se observa que el volumen tumoral del grupo IV fue significativamente menor que el de los grupos controles (I, II y III). En consecuencia, se concluyó que la TFD con Pc9-T1107 fue eficaz para disminuir la velocidad de crecimiento de los tumores. Puesto

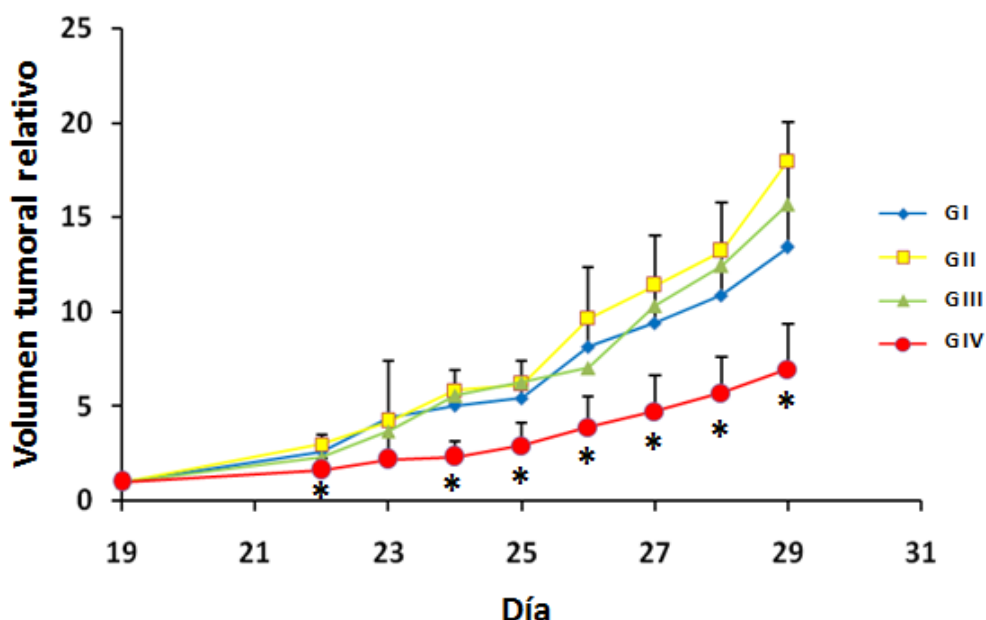


Figura 5.7. Efecto de Pc9-T1107 sobre el volumen tumoral. 100.000 células CT26 fueron inyectadas subcutáneamente en el flanco inferior derecho de ratones Balb/c. La TFD fue realizada como se indica en Materiales y Métodos (sección 2.2.3.4). Luego de medir el largo y el ancho de los tumores con un calibre, el volumen tumoral (v) fue estimado como $v = (\text{ancho})^2 \times \text{largo} \times 0,5$. En el gráfico se representa el volumen tumoral relativo promedio para cada grupo experimental ($n=8$) en

función del día del ensayo. ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. * $p < 0,05$ significativamente distinto de animales control (grupo I).

que las curvas correspondientes a la irradiación del tumor sin FS (grupo II) o a la administración de Pc9 sin irradiación (grupo III) no mostraron diferencias significativas con el grupo control I, es posible inferir que la eficacia del tratamiento requiere tanto de Pc9 como de su posterior irradiación.

Como se observa en las fotografías presentadas en el panel superior de la Figura 5.8, las diferencias en los volúmenes tumorales entre animales del grupo I y animales del grupo IV fueron evidentes a los 10 días p.i. (día 29), sobre todo teniendo en cuenta que el día de la irradiación los volúmenes eran similares. En el panel inferior de la Figura 5.8, se muestra que las diferencias en el tamaño tumoral fueron también evidentes al inspeccionar los tumores *ex vivo*.

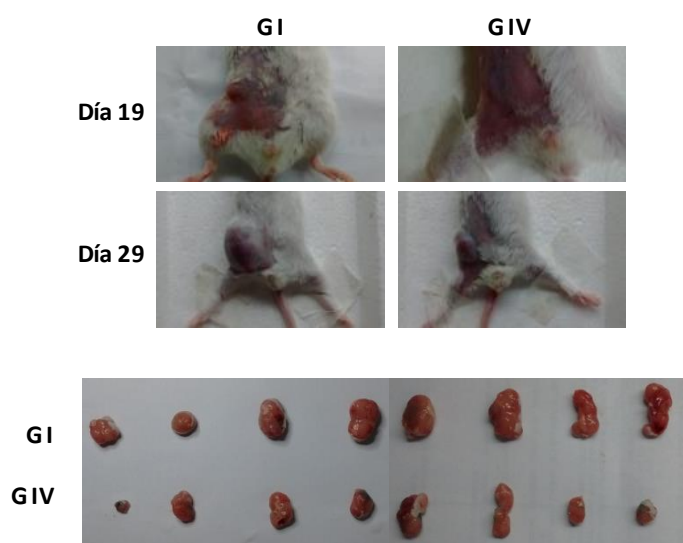


Figura 5.8. Aspecto de los tumores luego de TFD con Pc9-T1107. En el panel superior se presentan fotografías de animales controles y tratados antes de la irradiación (día 19), y en el momento de llevar a cabo la eutanasia (día 29). En el panel inferior se muestran las fotografías de los tumores del día 29.

5.2.2.2. Parámetros matemáticos.

Luego de determinar los volúmenes tumorales a distintos tiempos de tratamiento, fue factible calcular algunos parámetros matemáticos que permiten evaluar la eficacia de la TFD y a su vez comparar distintos tratamientos antitumorales entre sí. De esta forma, fue posible calcular el “Tiempo de Duplicación” (TD), el “Índice de Retraso en el Crecimiento Tumoral” (IRCT) y la “Inhibición del Crecimiento Tumoral” (ICT). El TD fue determinado como el tiempo necesario para duplicar el tamaño tumoral, mientras que el IRCT fue calculado como el cociente entre el tiempo de duplicación de tumores de animales tratados y el tiempo de

duplicación para animales controles. Por su parte, el ICT representa la relación porcentual entre el tamaño tumoral relativo promedio en ratones tratados con respecto al tamaño tumoral relativo promedio en ratones controles.

Tabla 5.1. Parámetros matemáticos relativos al crecimiento tumoral.

Tiempo de duplicación (días)	Grupo I	Grupo IV
	1,16 ± 0,52	3,97 ± 0,46
Índice de retraso en el crecimiento tumoral	3,4	

Como se muestra en la Tabla 5.1, el tiempo de duplicación del tamaño tumoral para el grupo IV fue 3,97 días, mientras que para el grupo I fue de 1,16 días. Es decir, en los animales tratados el tumor duplicó su volumen en un tiempo significativamente mayor que en animales controles ($p=0,0043$), siendo el crecimiento del tumor unas 3,4 veces más lento.

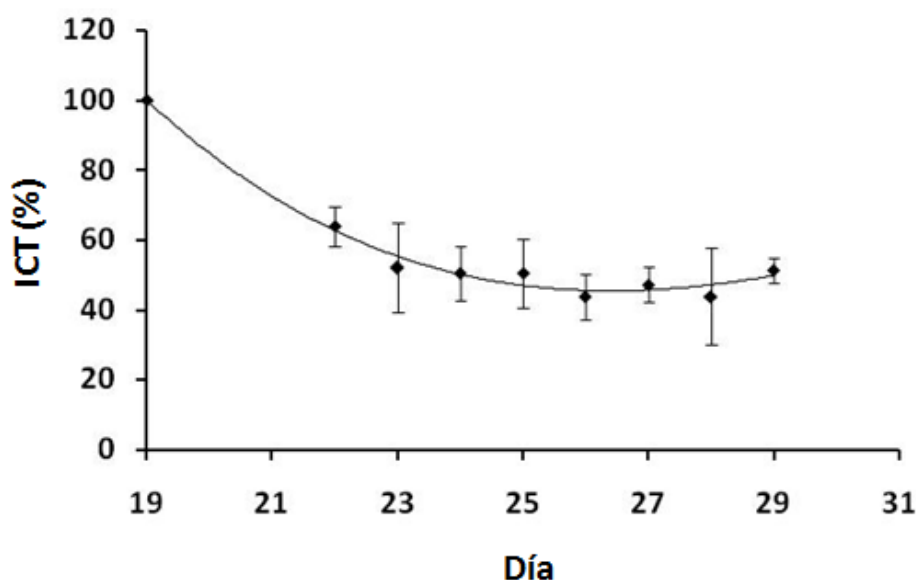


Figura 5.9. Efecto de Pc9-T1107 sobre la inhibición del crecimiento tumoral. La inhibición del crecimiento tumoral se calculó como el cociente entre el volumen relativo promedio para animales tratados y el volumen relativo promedio para animales controles, en forma porcentual. El gráfico representa el ICT en función del día del ensayo. Los resultados están expresados como la media ± ES de al menos tres experimentos independientes

En la Figura 5.9 se muestra que la inhibición del crecimiento tumoral fue aproximadamente 60% en el día 3 p.i. (día 22), y alcanzó luego un valor de 50% a partir del día 4 p.i. (día 23). Este valor se mantuvo estable hasta la finalización del experimento. En conclusión, la TFD con Pc9-T1107 logró reducir significativamente el volumen tumoral a la mitad.

5.2.2.3. Ensayo de sobrevida en ratones.

Para completar el análisis de las acciones *in vivo* de Pc9-T1107, evaluamos el efecto de la TFD en la sobrevida de los ratones Balb/c inyectados con las células CT26. Para ello, a lo largo del ensayo, si bien no se encontraron animales muertos durante los días de tratamiento, se sacrificaron aquellos animales que no cumplían con los indicadores de bienestar expuestos en Materiales y Métodos (sección 2.2.3.4). Siguiendo estos criterios, el número de animales sacrificados cada día en cada grupo se analizó con el programa GraphPad Prism mediante el método de Kaplan-Meier.

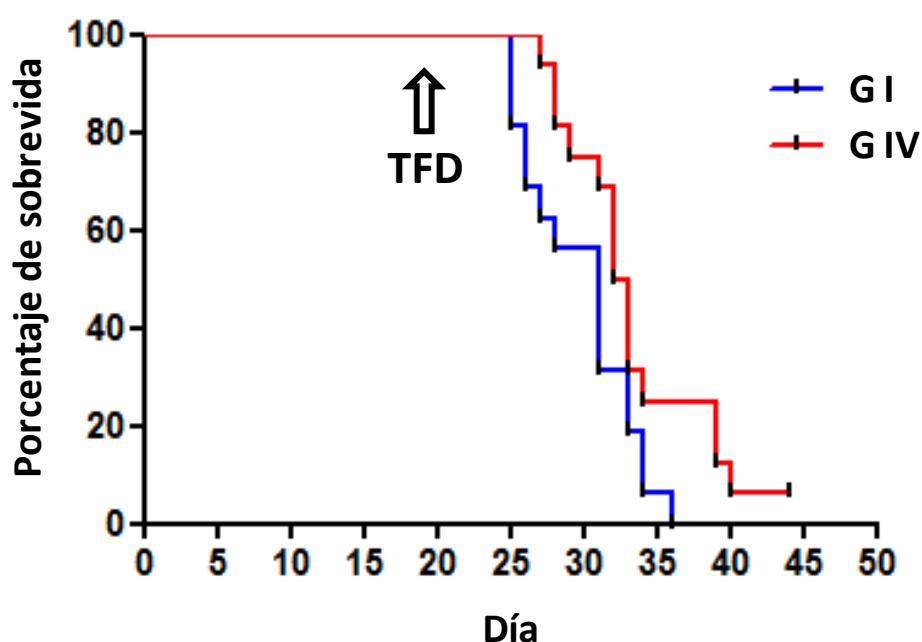


Figura 5.10. Efecto de Pc9-T1107 sobre la sobrevida de ratones Balb/c. Luego de la TFD con Pc9-T1107, los ratones fueron monitoreados diariamente evaluando el nivel de bienestar animal según los requisitos establecidos en Materiales y Métodos. Cuando por cuestiones éticas no era factible mantener un ratón, el mismo fue sacrificado y esta información ingresada al software GraphPad Prism. El gráfico presentado corresponde al método de Kaplan-Meier (n = 15). Análisis estadístico de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Como se muestra en la Figura 5.10, los animales del grupo IV presentaron una sobrevida ligeramente mayor que los animales del grupo I. Esta diferencia fue estadísticamente

significativa con un $p < 0,05$. Asimismo, dentro del grupo IV se detectó un caso excepcional (no mostrado) en el que la progresión tumoral fue notoriamente afectada por la TFD y el ratón recién debió ser sacrificado el día 75 p.i. (día 94 del ensayo).

5.2.3. Evaluación de la toxicidad de Pc9-T1107.

Una de las principales ventajas de la TFD sobre terapias convencionales, como la quimio y radioterapia, radica en el hecho de que constituye un tratamiento más selectivo para dañar el tejido tumoral y preservar mayoritariamente los tejidos sanos. Como se comentó en la Introducción (sección 1.2.1), más allá de la distribución que el FS pueda alcanzar una vez administrado al paciente en un cuarto oscuro, la irradiación circunscrita al área de localización del tumor, y eventualmente al tejido sano adyacente, permite que el FS actúe sólo en estas regiones. Las terapias convencionales, por el contrario, poseen la característica de ser menos selectivas y dañar tanto tejido sano como tumoral, produciendo por lo general numerosos efectos secundarios (Collier N.J. y col., 2018; Zhang J. y col., 2018).

En este contexto, con el fin de trasladar en un futuro el uso de la formulación Pc9-T1107 a ensayos clínicos, decidimos evaluar si luego de la TFD se dañaban otros tejidos más allá del tumor. La investigación de toxicidad se hizo a distintos niveles, desde el sistémico hasta lo relativo a órganos fisiológicamente relevantes.

5.2.3.1. Peso total de los animales.

Puesto que una disminución marcada en el peso de los animales es signo de toxicidad, se determinó el peso de los ratones en diferentes momentos del ensayo, desde antes de inyectar las células CT26 hasta la finalización del experimento. Cuando la reducción del peso corporal fue mayor al 20% el animal fue sacrificado, por cuanto se considera que en estas condiciones no es ético continuar con el ensayo y el animal debe ser sometido a eutanasia (Aston W.J. y col., 2017).

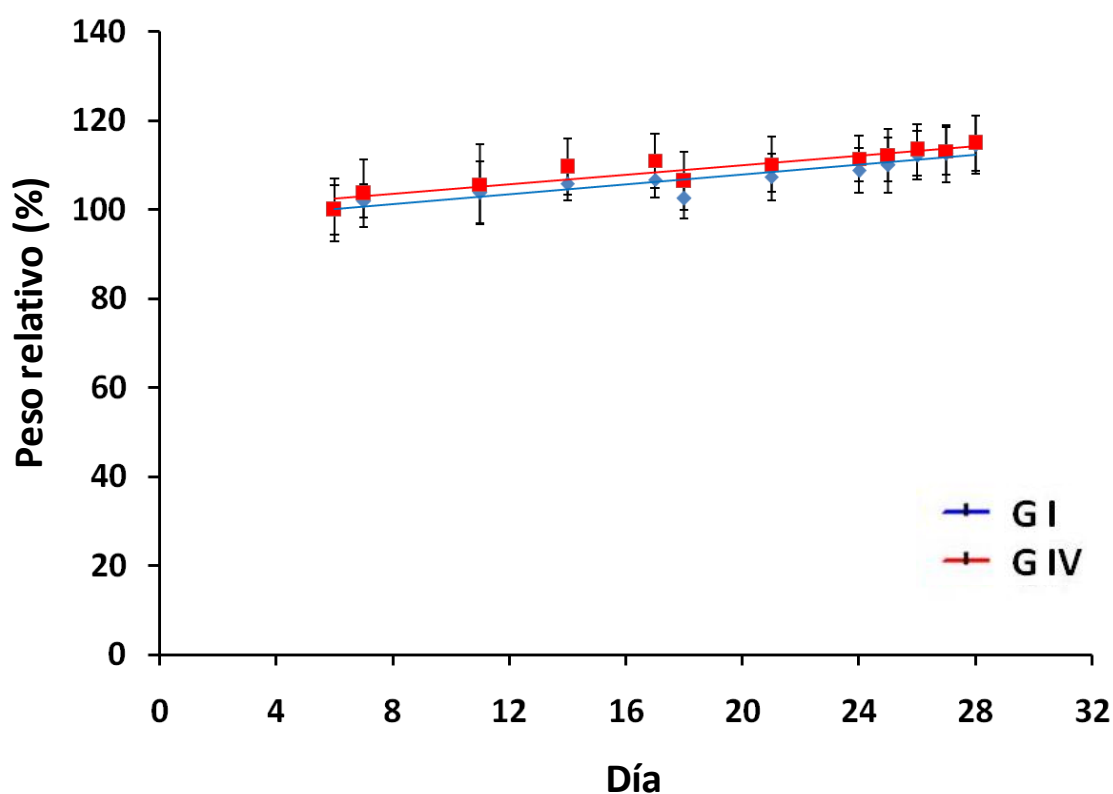


Figura 5.11. Efecto de Pc9-T1107 sobre el peso corporal de ratones Balb/c. El peso de los animales fue monitoreado regularmente desde antes de producirse la inyección de las células CT26 hasta la finalización del ensayo (día 29). A los animales controles se les administró intratumoralmente 100 μ l de solución fisiológica, mientras que los animales tratados recibieron 100 μ l de Pc9-T1107. El peso se expresa como el valor relativo porcentual al peso del día en que los animales llegaron al laboratorio. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. Test t de Student.

Como se observa en la Figura 5.11, el peso total de los ratones presentó una clara tendencia a aumentar tanto en animales controles como en animales tratados. Aún así, no existieron diferencias significativas entre el peso antes de inyectar las células tumorales y el peso al concluir el experimento. Este resultado representó un primer indicio de que la formulación Pc9-T1107 no fue tóxica en las condiciones evaluadas (35 μ g Pc9/kg ratón).

5.2.3.2. Análisis histológico de diversos tejidos.

Una vez finalizado el experimento *in vivo*, se extrajeron diferentes órganos fisiológicamente relevantes y los cortes histológicos fueron teñidos con una solución de hematoxilina-eosina para su posterior observación mediante microscopía óptica (Xia L. y col., 2014; Rong P. y col., 2014; Peng J. y col., 2013).

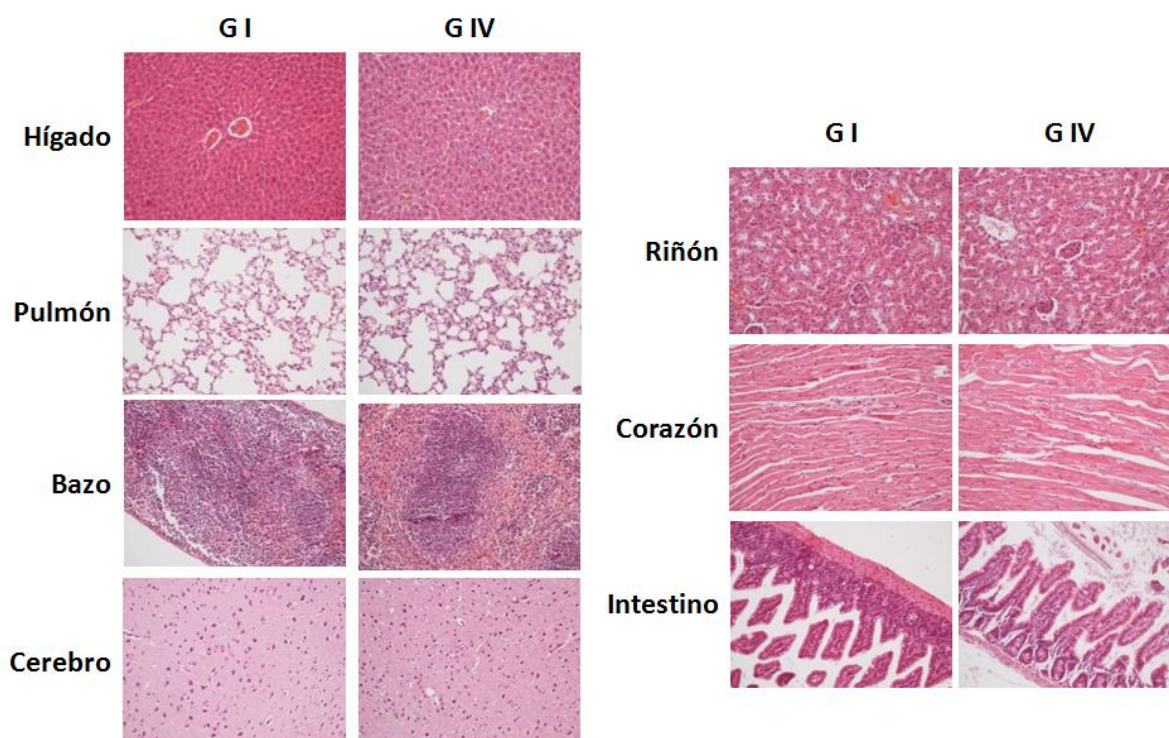


Figura 5.12. Efecto de Pc9-T1107 sobre diversos tejidos. Se administró intratumoralmente solución fisiológica o bien 35 $\mu\text{g/kg}$ de Pc9-T1107 por única vez a ratones machos Balb/c. Una vez finalizado el tratamiento (día 29), los diferentes órganos fueron fijados, deshidratados, incluidos en parafina, cortados en piezas de 5 μm de espesor y teñidos con hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.

Como se muestra en la Figura 5.12, ninguno de los tejidos estudiados presentó alteraciones debido a la TFD con Pc9-T1107. En el hígado no se observaron trabéculas desorganizadas ni sinusoides dilatados, ni zonas necróticas. Los hepatocitos presentaron características morfológicas normales. En los pulmones no se evidenciaron signos de neumonía, fibrosis, neumonitis ni hemorragia. Tampoco se observan áreas necróticas en el bazo. No existen signos de necrosis tubular ni cortical en los riñones, donde la estructura glomerular se percibió claramente. Las fibras cardíacas exhibieron buen aspecto, mientras que las vellosidades intestinales no presentaron edema ni necrosis. En resumen, la TFD con Pc9-T1107 no provocó toxicidad en ninguno de los tejidos evaluados.

5.2.3.3. Toxicidad hepática.

El hígado se encuentra entre los órganos más frecuentemente dañados por xenobióticos (González-Ponce H.A. y col., 2018; Singh D. y col., 2016). Esto se debe principalmente a la capacidad del tejido hepático de metabolizar compuestos extraños, por lo que se generan y coexisten dentro de este tejido una gran diversidad de sustancias potencialmente dañinas. La relevancia del hígado para el organismo nos llevó a indagar en mayor profundidad si existía alguna clase de daño como consecuencia de la TFD.

5.2.3.3.1. Actividad de enzimas hepáticas.

Con el propósito de evaluar la posible toxicidad del tratamiento a nivel hepático, realizamos la medición de la actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), dos proteínas cuya actividad se ve aumentada en caso de daño hepático. Además, este ensayo puede sugerir indirectamente el nivel de funcionalidad del órgano.

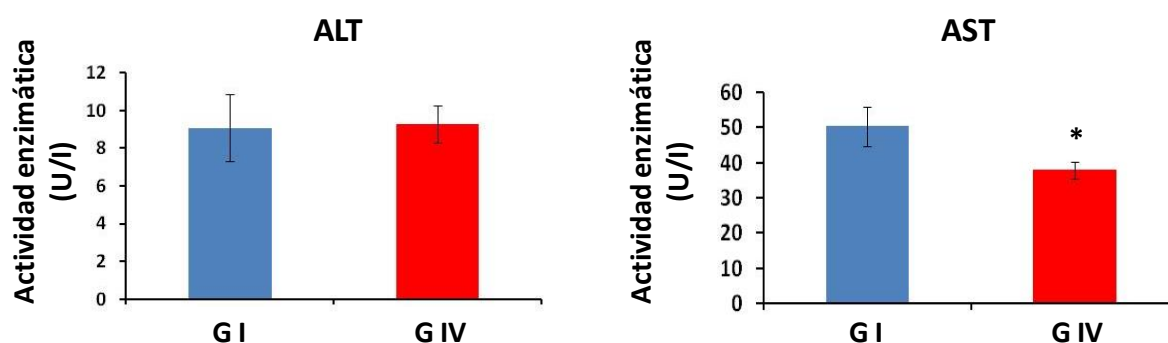


Figura 5.13. Efecto de Pc9-T1107 sobre la actividad de las enzimas hepáticas ALT y AST. Finalizado el tratamiento (día 29), la sangre de los ratones fue extraída y centrifugada para obtener los correspondientes sueros. Mediante un kit comercial se cuantificó la actividad enzimática de ALT y AST. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Test t de Student. * $p < 0,05$ significativamente distinto de animales controles.

Como se observa en la Figura 5.13, la TFD no produjo aumento en la actividad de las enzimas hepáticas ensayadas. Si bien se evidenció una ligera disminución en los niveles de actividad de AST luego del tratamiento, los valores se mantuvieron dentro de los rangos normales.

5.2.3.3.2. Peso del hígado relativo al peso total del animal.

La relación entre el peso del hígado y el peso total del animal ha sido descripta como una herramienta muy útil para evaluar la toxicidad en hígado. Esto se debe a la elevada sensibilidad de este parámetro para reflejar tanto hipertrofia celular como lipidosis (Andrade V.A. y col., 2014; Hall A.P. y col., 2012 ; Michael B. y col., 2007).

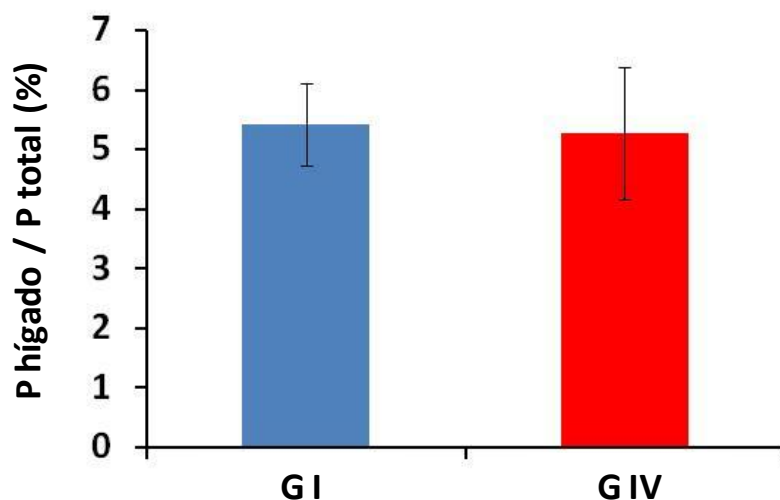


Figura 5.14. Efecto de Pc9-T1107 sobre el peso del hígado de ratones Balb/c. Una vez finalizado el ensayo los ratones fueron sacrificados, sus hígados extraídos y pesados. Los resultados se expresan como la relación porcentual entre el peso del hígado y el peso corporal y corresponden a la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Test t de Student.

Como se muestra en la Figura 5.14, el peso del hígado representó el mismo porcentaje del peso total en los dos grupos experimentales (alrededor del 5%). Este resultado, junto con los datos obtenidos para las enzimas hepáticas en animales controles y tratados, sugiere la ausencia de daño hepático luego de la TFD con Pc9-T1107.

5.2.4. Mecanismo de acción antitumoral de Pc9-T1107 *in vivo*.

Con el fin de dilucidar el mecanismo mediante el cual Pc9-T1107 inhibió el crecimiento tumoral, determinamos los niveles de expresión de diversas moléculas involucradas en procesos de muerte celular y realizamos también un análisis histológico de cortes de tumores.

5.2.4.1. Niveles del antígeno nuclear de proliferación celular.

En primer lugar, evaluamos si la TFD producía alteraciones en la tasa de proliferación de las células tumorales. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta se determinaron los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), un importante marcador de la tasa de replicación celular, tanto en cáncer colorrectal como en otros tipos de tumores (Guzinska-Ustymowicz K. y col., 2009).

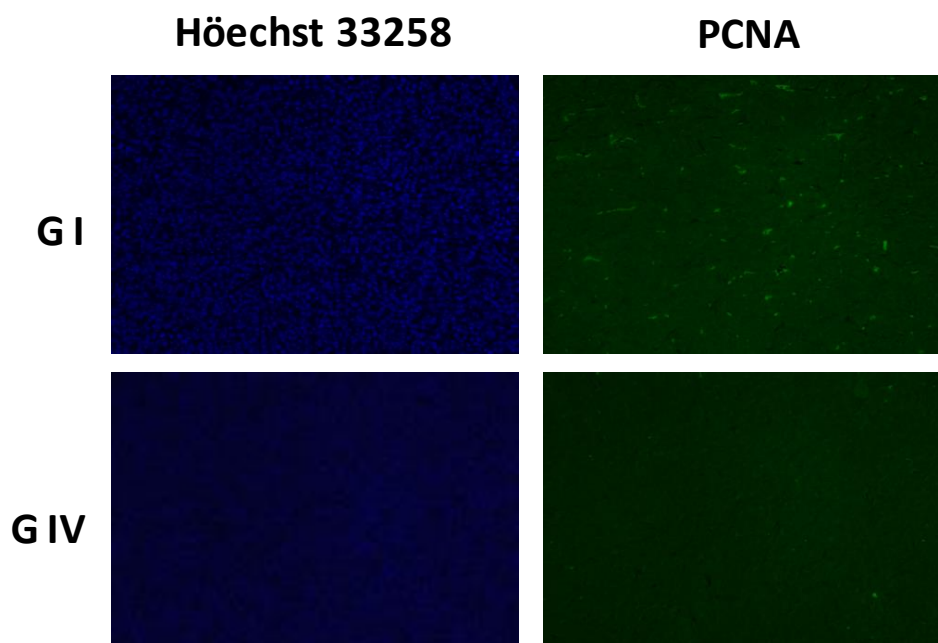


Figura 5.15. Efecto de Pc9-T1107 sobre la proliferación de células tumorales. Una vez finalizado el tratamiento, los tumores provenientes de animales controles (grupo I) o tratados (grupo IV) fueron extraídos, fijados y procesados como se describe en Materiales y Métodos. Tras la recuperación del antígeno utilizando ácido cítrico 10 mM a 92°C, se incubaron con un anticuerpo específico de conejo anti-PCNA. A continuación, se agregó un anticuerpo secundario marcado con FITC y los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 2 μ M. Finalmente, los tejidos fueron examinados mediante microscopía de fluorescencia. Aumento: 200X.

Los tumores provenientes de animales del grupo I (control) (Figura 5.15) presentaron un patrón punteado de emisión verde. Esta emisión se debió al fluoróforo FITC acoplado a IgG de ratón anti-conejo que se unió al anticuerpo anti-PCNA utilizado. En cambio, en los tumores de los animales del grupo IV (tratados) no se observó el mismo patrón que en los cortes de animales controles, si no una menor expresión de la proteína PCNA. En la Figura 5.15 se muestra también, como control de células presentes en cada campo, la tinción de los núcleos celulares con Hoechst 33258. De esta manera, la disminución observada en los niveles de PCNA permitió concluir que la tasa de proliferación de los tejidos tumorales tratados con Pc9-T1107 fue menor que la de los animales controles.

5.2.4.2. Análisis histológico de cortes de tumores.

Posteriormente, cuantificamos el porcentaje de tejido histológicamente necrótico, un concepto utilizado desde el punto de vista histológico para indicar tejido no viable. Este parámetro no refleja el mecanismo de muerte celular, es decir, no implica que el proceso de muerte sea de tipo necrótico, ya que también podría ser debido a apoptosis, autofagia u otra modalidad de muerte. Para realizar esta determinación, se analizaron fotografías de cortes

de tumores teñidos con hematoxilina-eosina provenientes tanto de animales controles como tratados. El análisis de las imágenes obtenidas, utilizando el programa ImageJ, permitió cuantificar el porcentaje de área necrótica por campo.

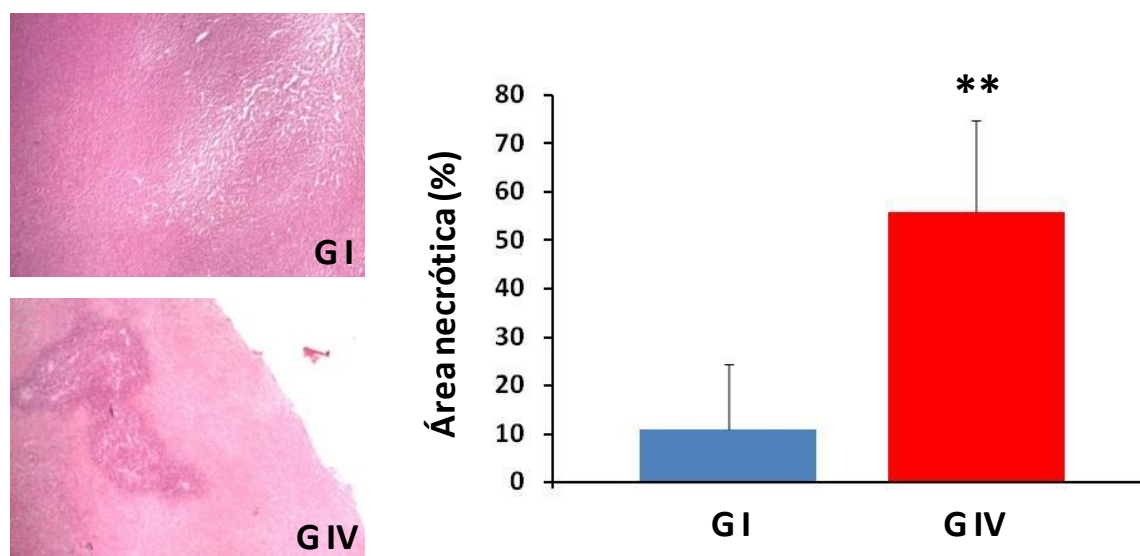


Figura 5.16. Efecto de Pc9-T1107 sobre la histología tumoral. Se administró intratumoralmente solución fisiológica o bien 35 $\mu\text{g/kg}$ de Pc9-T1107, por única vez, a ratones machos Balb/c. Una vez finalizado el tratamiento, los tumores provenientes de animales controles (grupo I) o tratados (grupo IV) fueron extraídos, fijados y procesados como se describe en Materiales y Métodos. El porcentaje de área necrótica (panel derecho) en los tumores (panel izquierdo) se cuantificó utilizando el software ImageJ. Aumento: 40X. Los resultados están expresados como la media \pm ES de al menos tres experimentos independientes. Test t de Student. ** $p < 0,005$ significativamente distinto de animales controles.

Como se muestra en la Figura 5.16 (panel izquierdo), la imagen representativa de un tumor del grupo I (control) muestra mayoritariamente células viables, mientras que un corte correspondiente a un animal del grupo IV (tratados) presenta áreas de menor intensidad, indicativas de necrosis. El análisis cuantitativo de los resultados obtenidos (Figura 5.16, panel derecho) reveló un aumento significativo del porcentaje del área necrótica en los tumores provenientes de animales tratados con respecto a tumores controles (56% *versus* 11%), confirmando que la TFD con Pc9-T1107 generó la muerte de células tumorales y no sólo una disminución de los niveles de proliferación.

5.2.4.3. Participación de miembros de la familia Bcl-2, PARP-1 y caspasa 3.

Previamente, se comentó la relevancia de las proteínas de la familia Bcl-2, PARP-1 y caspasa 3 en procesos de muerte (Introducción, sección 1.1.4.1). Debido a su rol trascendental en la respuesta apoptótica, decidimos evaluar los niveles de expresión de

estas moléculas en los tumores de animales tratados y compararlos con los controles. Las técnicas empleadas fueron WB e inmunofluorescencia indirecta.

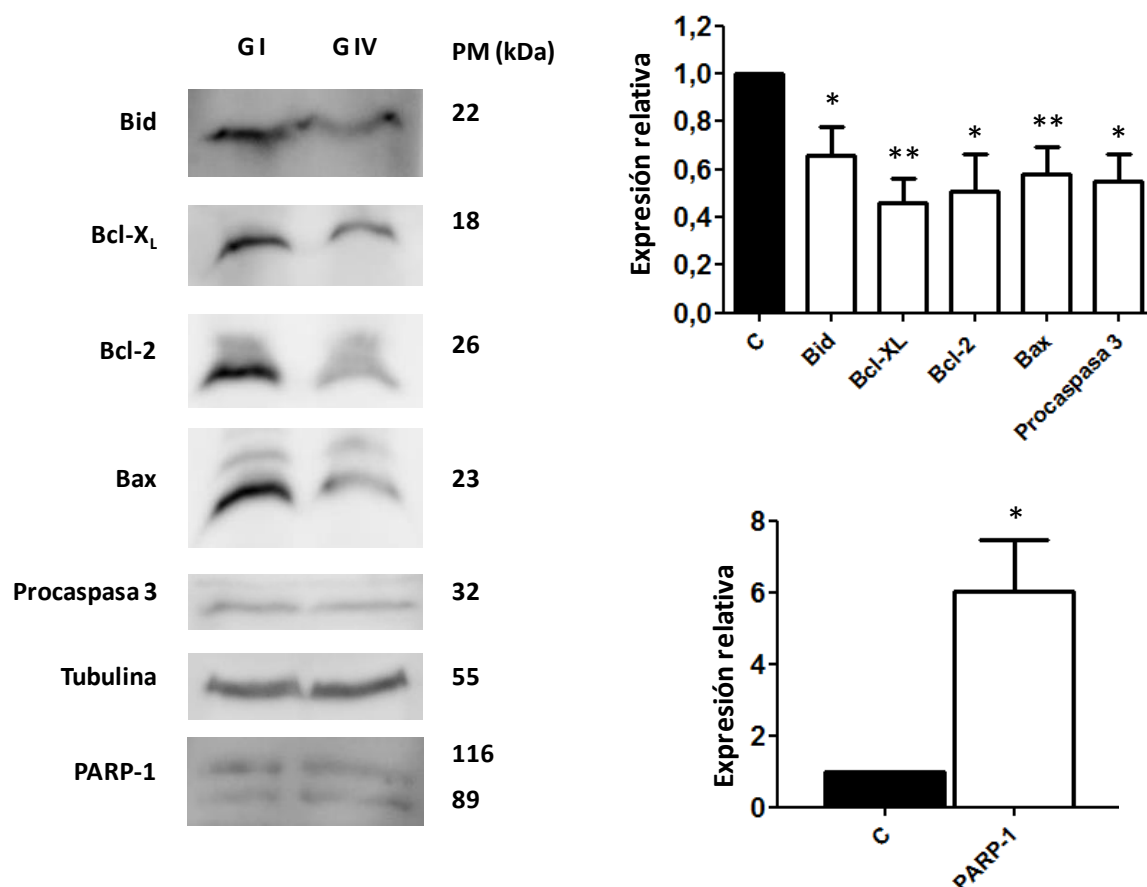


Figura 5.17. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles tumorales de proteínas de la familia Bcl-2, procaspasa 3 y PARP-1. Los lisados tumorales (100 µg) obtenidos a partir de ratones controles y tratados, sacrificados el día 29, fueron sometidos a WB. En el panel izquierdo se muestra un experimento representativo y en el derecho el análisis densitométrico de las bandas de al menos tres experimentos independientes. La expresión relativa de PARP-1 corresponde al cociente entre los niveles de expresión del fragmento de 89 kDa con respecto a la proteína entera (116 kDa). Los resultados están expresados como la media ± ES. Test t de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ significativamente distinto de animales controles.

Como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 5.17, se observó una disminución significativa de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L, así como también de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bid, dando lugar posiblemente ésta última a mayores cantidades del fragmento pro-apoptótico tBid. A su vez, los menores niveles de procaspasa 3 sugieren la activación de esta proforma por clivaje. Por su parte, la fragmentación de PARP-1 indica la inactivación de esta molécula que resulta clave para la reparación del ADN.

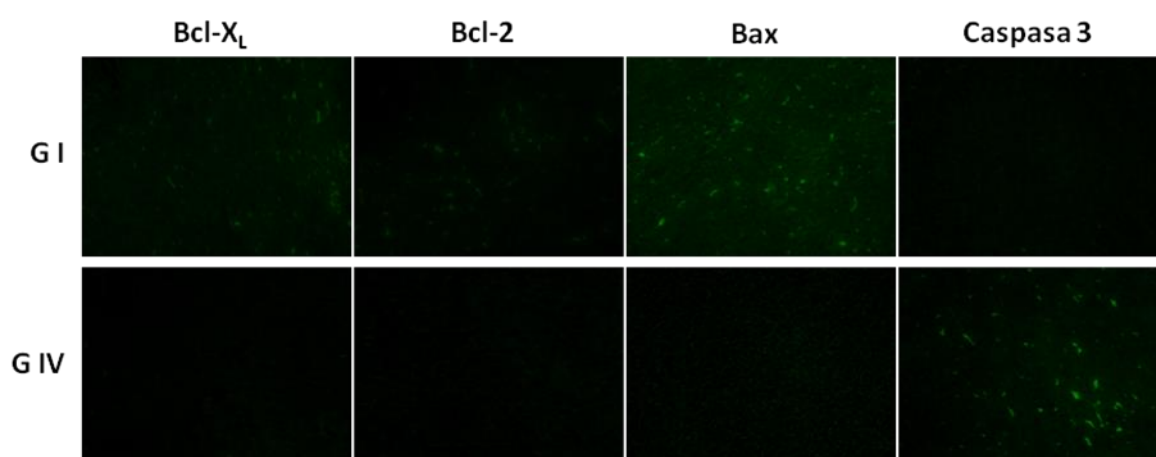


Figura 5.18. Efecto de Pc9-T1107 sobre los niveles tumorales de proteínas de la familia Bcl-2 y caspasa 3. Una vez finalizado el tratamiento, los tumores provenientes de animales controles (grupo I) o tratados (grupo IV) fueron extraídos, fijados y procesados como se describe en Materiales y Métodos. Tras la recuperación del antígeno utilizando ácido cítrico 10 mM a 92°C, se procedió a bloquear e incubar con anticuerpos específicos de conejo para Bcl-X_L, Bcl-2, Bax y caspasa 3. La evaluación mediante microscopía de fluorescencia se realizó luego de agregar un anticuerpo secundario de ratón anti-conejo acoplado a FITC. Aumento: 200X.

También se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para algunas de las proteínas previamente estudiadas por WB (Figura 5.18). Así, por ejemplo, se observó menor intensidad de fluorescencia para las proteínas Bcl-X_L, Bcl-2 y Bax en los cortes histológicos de animales tratados. Asimismo, los niveles de caspasa 3, determinados mediante el empleo de un anticuerpo que reconoce específicamente a la variante activa, se vieron incrementados en los tumores provenientes de animales expuestos a TFD con Pc9-T1107. Debe aclararse que cada fotografía analizada para la emisión verde contó con su contraparte tomada en el mismo campo para la emisión azul proveniente de núcleos celulares marcados con H \ddot{o} chst 33258. Estos controles, aunque no se incluyeron en la Figura 5.18, nos permiten asegurar que un bajo nivel de emisión de fluorescencia verde se debe a los bajos niveles de la proteína en cuestión y no a la ausencia de células en ese campo.

5.3. Discusión.

Los modelos celulares tridimensionales han revelado ser una herramienta *in vitro* muy útil como aproximación a la caracterización del comportamiento *in vivo* de drogas en estudio (Friedrich J. y col., 2009; Mehta G. y col., 2012). En nuestro sistema, la TFD con Pc9-T1107 resultó ser eficaz para producir una reducción del volumen y viabilidad de esferoides de células CT26, luego de 24 h post-irradiación. El valor de IC₅₀ obtenido (370 ± 11 nM) fue 37

veces mayor al encontrado en cultivos bidimensionales. Una menor potencia del efecto citotóxico en modelos 3D respecto de los cultivos 2D ha sido previamente atribuida a las características semejantes de los esferoides y los tumores. Entre ellas, por ejemplo, se pueden mencionar la existencia de un gradiente de nutrientes y oxígeno. También, las distintas concentraciones de FS o dosis de energía lumínica que alcanzan el núcleo o la capa más superficial del esferoide (Friedrich J. y col., 2007; Lin R. y Chang H., 2008; Torisawa Y.S. y col., 2005; Imamura Y. y col., 2015). Aún así, estas diferencias en la potencia podrían también estar parcialmente vinculadas al número de células expuestas al FS en cada ensayo de citotoxicidad, un concepto sobre el que la literatura no ha ahondado hasta el momento a la hora de comparar los valores de IC_{50} entre modelos bi y tridimensionales.

Otros grupos de trabajo han presentado previamente resultados que demuestran la muerte de cultivos celulares tridimensionales luego de TFD (Fujishiro T. y col., 2018; Zuchowska A. y col., 2017). En particular, en la investigación de nuevos tratamientos para el CCR se han empleado sistemas 3D en ensayos preclínicos utilizando como FS la porfirina Foscan en células humanas HT29 (Marchal S. y col., 2005), hipericina (derivado de la antraquinona) en células humanas HCT 116 y HT29 (Khot M.I. y col., 2018), o bien un derivado de hematoporfirina en la línea humana WiDr (West C.M.L. y Moore J.V., 1992). No obstante, esta es la primera vez que se evalúa un protocolo preclínico para TFD en cultivos tridimensionales de células CT26, y se demuestra, además, un mecanismo de muerte celular apoptótico.

Diversos ensayos clínicos han sido llevados adelante con resultados alentadores utilizando TFD para el tratamiento del cáncer colorrectal (Kawczyk-Krupka A. y col., 2015). En los mismos se emplearon una serie de FS como el ácido 5-aminolevulínico y derivados de hematoporfirina o clorina (Hatakeyama T. y col., 2013; Kawczyk-Krupka A. y col., 2015; Namikawa T. y col., 2015). Las Pcs son una familia de FS de interés, ya que presentan una mayor absorbancia en 670 nm con respecto a otros compuestos. Teniendo en cuenta que en esta región del espectro la luz penetra más profundamente en los tejidos, es posible tratar zonas del tumor que se encuentren más distantes de la capa externa (Taquet J.P. y col., 2007; Calzavara-Pinton P.G. y col., 2007; Moghissi K. y col., 2015). Así, se define la ventana terapéutica entre 600 y 800 nm, que comprende longitudes de onda suficientemente “altas” para minimizar la absorción por interferentes (melanina, hemoglobina, aminoácidos, ácidos nucleicos) y obtener una mejor penetración tisular, y suficientemente “bajas” para asegurar que una mayor energía lumínica excite al FS (Ethirajan M. y col., 2011). Estos motivos han propiciado las investigaciones con Pcs en ensayos clínicos. El tratamiento de tejidos malignos en pulmón, esófago y piel se ha abordado con Pcs de aluminio y silicio en estudios de fase I/II (Miller J.D. y col., 2007;

Allison R.R. y Sibata C.H., 2010). Sin embargo, no se han realizado aún ensayos clínicos con Pcs para el tratamiento de cáncer colorrectal (Kawczyk-Krupka A. y col., 2016). Por ende, hemos decidido avanzar en el análisis de la eficacia de la TFD con Pc9-T1107 en un modelo *in vivo* para esta patología.

Las condiciones experimentales a utilizar en el modelo *in vivo*, en relación al número de células CT26 inyectadas, vía de administración, momento de inyección del FS, energía de irradiación y número de irradiaciones se establecieron sobre la base de datos presentados en una no muy vasta literatura para combinaciones CT26-Balb/c (Sanovic R. y col., 2011; Haddad R. y col., 2000; Kashtan H. y col., 1996). La incorrecta conjugación de estos factores puede resultar no solo en un ensayo no efectivo de TFD, sino también llevar a una marcada letalidad en los animales utilizados. En este sentido, Ferrario A. y Corner C.J. (1990) asociaron una mayor letalidad en diferentes cepas de ratones tratados con Photofrin®, entre ellos Balb/c, con una mayor energía de irradiación, y sugirieron que la TFD induciría un síndrome traumático mediado por sustancias vasoactivas endógenas, tales como prostaglandinas, tromboxano e histamina.

En cuanto a la elección del sexo de los animales, se puede encontrar en la literatura modelos singénicos CT26-Balb/c realizados tanto en hembras como en machos. Al día de hoy, existe consenso dentro de la comunidad científica con respecto a que un mismo ensayo llevado adelante en uno u otro sexo puede arrojar resultados disímiles (Curry B., 2001; Zheng S. y col., 2007), debido probablemente a los distintos perfiles hormonales, conductuales y metabólicos. Basándonos en estas evidencias, y teniendo en cuenta que en el sexo masculino se encuentra la mayor tasa de incidencia de CCR, decidimos realizar la evaluación preclínica de Pc9-T1107 en ratones machos.

Con respecto a las vías de administración, si bien las vías intraperitoneal e intravenosa han sido las más empleadas en ensayos preclínicos de TFD, la inyección intratumoral está siendo utilizada cada vez con mayor frecuencia para FSs vehiculizados en nanopartículas. Esto se debe a que la farmacocinética y biodistribución de estas formulaciones no han sido detalladamente investigadas, por lo que la elección de la vía intratumoral permite, en principio, maximizar la respuesta al tratamiento (Silva Z.S. y col., 2015).

Uno de los parámetros específicos que es necesario precisar cuando se genera un protocolo de trabajo en TFD es el tiempo que se debe dejar transcurrir entre la administración del FS y la irradiación del tumor. Esto resulta clave para lograr una correcta activación del FS y generar una cantidad de ROS suficientes para desencadenar un daño citotóxico. Tanto mediante el sistema de toma de imágenes *in vivo*, como a través de microscopía confocal, hemos encontrado que, luego de la administración del FS, 24 h es un tiempo adecuado para producir la irradiación del tumor de células CT26. Este tiempo coincide con el habitualmente seleccionado en una variedad de protocolos de TFD

reportados para otros FSs (Belicha-Villanueva A. y col., 2012; Rong P. y col., 2014; Wu D. y col., 2013; Peng J. y col., 2013).

La efectividad de la terapia con Pc9-T1107 fue demostrada mediante la evaluación de cuatro grupos experimentales. Los ensayos de progresión tumoral permitieron demostrar que la TFD con Pc9-T1107 fue capaz de retrasar el crecimiento tumoral, obteniéndose una reducción del 50% del volumen tumoral en los animales tratados con respecto al grupo controles (grupo IV *versus* grupo I). La incorporación en el protocolo de trabajo de grupos de ratones que fueron sólo irradiados (grupo II), o tratados con la formulación sin irradiación (grupo III), nos permitió demostrar que el efecto de Pc9-T1107 se logra sólo con la combinación entre el FS y la iluminación del tejido tumoral. En los grupos II y III no se observó una modificación en los volúmenes tumorales con respecto al control (grupo I).

Si bien demostramos que la TFD con Pc9-T1107 logró reducir significativamente el crecimiento tumoral, es posible aún plantear variaciones del protocolo experimental que lleven a mejorar la eficacia del tratamiento. Así, por ejemplo, se podría modificar la potencia o la energía de la irradiación, y/o el número de veces que se irradia. Aunque la mayoría de los protocolos preclínicos utilizan una única irradiación, el empleo de irradiaciones consecutivas constituye una estrategia abordada exitosamente por varios autores (Peng J. y col., 2013; Zhang M. y col., 2008). Asimismo, el grupo de van der Veen N. y col. (1994), luego de comparar la efectividad entre protocolos con una o varias irradiaciones, demostraron que sólo con una doble irradiación del tejido tumoral conteniendo 5-ALA se llegaba a producir una respuesta necrótica mantenida en el tiempo.

Distintos parámetros matemáticos han sido desarrollados para comparar entre sí la efectividad de las terapias en cuanto a su capacidad para enlentecer el crecimiento tumoral. Al calcular estos parámetros con nuestros resultados y contrastarlos con otras terapias aplicadas en el modelo singénico CT26-Balb/c, la formulación Pc9-T1107 demostró ser superior a un protocolo en el que se administró intratumoralmente un plásmido con el objetivo de sobre-expresar VP3 (Ismail R. y col., 2016). Esta proteína, derivada de un virus aviar, posee la capacidad de provocar apoptosis mediante la activación de diversas vías de señalización. Asimismo, el tratamiento con Pc9-T1107 fue superior a la terapia de silenciamiento de la proteína de superficie CD147, implicada en supervivencia y quimiorresistencia (Ismail R. y col., 2016). Una tercer estrategia presentada por el grupo de Ismail R. y col. (2016) para el tratamiento del CCR consistió en combinar las dos técnicas previamente mencionadas. Aún así, tampoco se obtuvieron resultados que superen el desempeño de la TFD con Pc9-T1107. Mientras que los valores de inhibición del crecimiento tumoral (ICT) fueron semejantes en nuestro tratamiento y los propuestos por Ismail R. y col., nuestro protocolo presentó un mayor índice de retraso en el crecimiento tumoral (IRCT) (3,4 en nuestro protocolo *versus* 2,3 en el mejor resultado del grupo de

Ismail R. y col.). Es decir, la TFD con Pc9-T1107 permitió enlentecer en mayor medida el tiempo de duplicación del volumen tumoral. Por otro lado, debido a un mayor IRCT, Pc9-T1107 resultó superior a la quimioterapia con fenil bencenosulfonil hidrazidas para retrasar el crecimiento tumoral de células CT26 implantadas en ratones Balb/c (Lin S. y col., 2016). Estas ventajas sobre la reducción del volumen tumoral deben considerarse junto con las concernientes al menor número de efectos secundarios que presenta la TFD.

El concepto de que la TFD no sólo enlentece la progresión tumoral sino que además permite extender la sobrevida es un tema que ha sido abordado por varios autores (Zhan Q. y col., 2011; Szokalska A. y col., 2009). Se ha comprobado, a partir de ensayos clínicos, que la eficacia de los tratamientos antitumorales no debe evaluarse sólo en función de la inhibición del crecimiento tumoral sino además en la sobrevida alcanzada (Day C. y col., 2015). En este sentido, luego de la TFD con Pc9-T1107 hemos observado una diferencia significativa en la sobrevida de los animales al comparar ratones controles y tratados, siendo ligeramente mayor la sobrevida en este último grupo. No obstante, pensamos que las modificaciones al protocolo experimental planteadas anteriormente con el fin de potenciar el efecto antitumoral de la TFD podrían resultar sumamente beneficiosas para obtener resultados aún mejores de sobrevida.

Una de las principales ventajas de la TFD por sobre otras terapias antitumorales es la menor cantidad de efectos secundarios asociados (Collier N.J. y col., 2018; Zhang J. y col., 2018). Si bien dependen del tratamiento específico considerado, los principales efectos adversos reportados por quimio y radioterapia son mielosupresión, alopecia, infertilidad, alteraciones del tracto gastrointestinal y otros. La irradiación selectiva del tejido tumoral permite que la TFD no genere importantes efectos adversos. Aún así, un FS potente podría provocar toxicidad en otros tejidos aún sin ser estos irradiados (Leach M.W. y Peaston E., 1994). Si esto ocurriera, el FS no sería un candidato de interés para ser utilizado en ensayos clínicos. Un indicio de toxicidad sistémica generada por un tratamiento oncológico es el peso corporal de los animales (Xia L. y col., 2014; Rong P. y col., 2014). En particular, Pc9-T1107 no demostró alterar la cinética de aumento de peso propia de ratones controles, una ventaja con respecto a otras TFD estudiadas en forma preclínica donde esto sí ocurrió. Un ejemplo de ello fue el uso de Photofrin® o 2-(1-hexiloxietil)-2-devinilpiro feoforbido-a (HPPH) para el tratamiento del cáncer escamoso esofágico humano (Wu D. y col., 2013). Resultados similares en los que Pcs de zinc(II) no alteran el normal desarrollo del peso de ratones han sido presentados por otros autores, en particular para el tratamiento de hepatocarcinoma celular en roedores C57/6J (Xia L. y col., 2014).

Los ensayos de tinción con hematoxilina-eosina evidenciaron ausencia de toxicidad en los principales órganos luego de la TFD con Pc9-T1107. Una observación análoga ha sido realizada para una Pc de zinc(II) en el trabajo de Xia L. y col. (2014), así como para una Pc

vehiculizada en nanoesferas en ratones Balb/c (Peng J. y col., 2013). En particular, el hígado es un tejido que puede ser dañado debido a su activo rol en el metabolismo de fármacos (González-Ponce H.A. y col., 2018; Singh D. y col., 2016). Si bien no se observaron alteraciones a nivel hepático en nuestro modelo, algunos antecedentes sugerían una posible toxicidad en este tejido para cierto tipo de Pcs. Estos reportes se refieren a la hepatotoxicidad provocada por una Pc azufrada como consecuencia del tratamiento de carcinoma de células escamosas en gatos (Leach M.W. y Peaston E., 1994). Este daño se caracterizó por procesos necróticos, inflamación y aumento en la actividad de ALT y AST. Sobre la base de estos antecedentes, decidimos evaluar en mayor profundidad si la TFD producía algún efecto hepatotóxico. Para ello, medimos la actividad enzimática de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), dos proteínas cuya actividad se ve aumentada en caso de daño hepático. Los valores absolutos de actividad enzimática, alrededor de 9 U/l para ALT y 45 U/l para AST, se encontraron dentro de los valores normales registrados para ratones Balb/c (Oliveira Freitas E. y col., 2015; Ciou S. y col., 2014; Szymańska J.A. y col., 1996). Además, la relación entre el peso del hígado y el peso total de los animales fue normal, ubicándose en aproximadamente un 5% (Andrade V.A. y col., 2014; Hall A.P. y col., 2012; Michael B. y col., 2007). De esta forma, descartamos un efecto tóxico de la TFD sobre el hígado, que sí ha sido observado en quimioterapias basadas en oxaliplatino, ciclofosfamida o vincristina (Sharma A. y col., 2014). El patrón de toxicidad resultante luego de la administración de estos agentes antitumorales ha sido definido como síndrome obstructivo sinusoidal, una afección caracterizada por hepatomegalia asociada a dolor abdominal, ascitis, encefalopatía, trombosis, hipertensión e incluso trombocitopenia.

Diversas modalidades de muerte celular, tales como apoptosis, necrosis y/o autofagia, pueden contribuir a la eliminación de las células tumorales luego de la aplicación de TFD (Kessel D., 2018). Antes de indagar acerca de estos procesos, demostramos que la TFD produjo efectivamente una disminución en la proliferación celular, evidenciada por una significativa disminución en los niveles de PCNA luego del tratamiento. PCNA es una proteína nuclear marcadora del proceso de división celular y bio-marcadora de una serie de cánceres, entre ellos el carcinoma colorrectal (Guzinska-Ustymowicz K. y col., 2009; Yang H.B. y col., 1996). Su acción está asociada a la de la ADN polimerasa, enzima sintetizada poco antes de la fase S del ciclo celular. Se ha demostrado que la expresión de PCNA en este tipo de tumores se correlaciona con el grado de malignidad, la infiltración vascular y la sobrevida.

Diversos grupos de trabajo han planteado la utilidad de la tinción de cortes tumorales con hematoxilina-eosina para estudiar una posible necrosis tisular provocada por la TFD (Rong P. y col., 2014; Wu D. y col., 2013). El análisis histológico de los tumores de células CT26

en ratones Balb/c permitió confirmar la muerte de las células luego de la TFD con Pc9-T1107. Cabe mencionar que la proporción de tejido tumoral identificado como necrótico (56%) coincide con los valores de ICT, ambos parámetros calculados a partir de las estimaciones de los volúmenes tumorales.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que en el modelo *in vivo* se genera una respuesta apoptótica similar a la observada en cultivos bi y tridimensionales. La misma se encuentra caracterizada por una disminución en los niveles de Bid, Bcl-X_L, Bcl-2 y Bax, mientras que aumenta la actividad de caspasa 3 y la proporción de PARP-1 clivado. La capacidad de otras Pcs de zinc(II) para activar caspasa 3 luego de una TFD *in vivo* ha sido previamente descrita en un modelo de adenocarcinoma de mama en ratones Balb/c (Yslas E.I. y col., 2009).

Al realizar una evaluación *in vivo*, el mecanismo de muerte adquiere mayor relevancia en función de la magnitud de la reacción inmune asociada que podría generarse. En el caso de una TFD, como la de Pc9-T1107, que provoca la muerte de las células tumorales mediante apoptosis, la respuesta inflamatoria sería limitada (Fabris C. y col., 2001). En los casos de neoplasias *in situ* como nuestro modelo, la inducción de una vía apoptótica es conveniente, particularmente para evitar la liberación de proteasas con capacidad de degradar la matriz extracelular y favorecer la diseminación del tumor. Estas proteínas pueden ser secretadas por macrófagos y polimorfonucleares en contextos inflamatorios asociados a necrosis (Lightdale C. y col., 1995). Este tipo de protocolos que inducen una potente respuesta apoptótica resultan la mejor elección en aquellas patologías en las que se busca una rápida reducción del tamaño tumoral, como es el caso de cánceres esofágicos u obstructivos (Lightdale C. y col., 1995; Lam S. y col., 1991). En cambio, la muerte por necrosis podría ser considerada una opción terapéutica para el tratamiento de tumores metastásicos o infiltrantes, ya que en este caso se requiere una respuesta sistémica y no sólo local (Korbelik M., 1996).

En conclusión, hemos demostrado un mecanismo de muerte similar al de los cultivos bidimensionales en un modelo celular más complejo, como los esferoides. Cuando indagamos en el modelo *in vivo*, comprobamos que la TFD con Pc9-T1107 fue efectiva para retrasar el crecimiento tumoral y prolongar la sobrevida. La activación de un proceso de muerte de tipo apoptótico constituye una alternativa promisorio para el tratamiento del modelo de cáncer colorrectal aquí estudiado. Asimismo, comprobamos que la formulación Pc9-T1107 no generó toxicidad sistémica y tampoco resultó tóxica en algunos tejidos no irradiados. Aunque aún no lo hemos estudiado *in vivo*, no podemos descartar la participación de una respuesta autofágica tendiente a contrarrestar el efecto de la TFD, en forma similar a lo observado *in vitro* en cultivos 2D.

El cáncer es una patología caracterizada por la proliferación descontrolada de células aberrantes que pueden producir metástasis al migrar de su tejido de origen a un tejido secundario, para crear así un nuevo tumor. El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores de mayor prevalencia y representa, a nivel mundial y sin distinguir entre sexos, alrededor del 15% de los casos de cáncer. En Occidente, se ubica como el segundo tipo de tumor con mayor incidencia, con un caso nuevo en varones cada 16 minutos. En Argentina, el CCR es el segundo tipo de tumor más frecuente (12% del total) y provoca 20 muertes por día.

La terapia fotodinámica (TFD) es una estrategia terapéutica utilizada en oncología basada en el uso de una molécula, denominada fotosensibilizador (FS), que se acumula en el tejido a tratar. La irradiación lumínica del FS, en presencia de oxígeno, produce su fotoactivación y la consecuente generación de especies citotóxicas que llevan a la destrucción del tumor. Esta terapia cuenta con una serie de ventajas con respecto a las terapias convencionales, derivadas de la menor cantidad de efectos secundarios asociados. Aún así, hoy en día aún no se aplica a todo tipo de tumores. Algunos de los motivos para ello son la incapacidad de tratar tumores profundos y el prolongado tiempo de eliminación del FS del organismo. Los FSs actualmente en uso en la clínica, además, absorben la energía lumínica en un rango del espectro visible que no es el óptimo para maximizar la penetración en los tejidos. Es por ello que su empleo se limita al tratamiento de tumores superficiales. En este contexto, existe la necesidad de continuar la búsqueda de nuevos y mejores FSs.

Las ftalocianinas (Pcs) son una familia de moléculas con potencial aplicación en TFD, ya que poseen varias características que las asemejan a un FS ideal. Entre ellas, podemos mencionar una alta absortividad de luz en el rango de 700-800 nm, una eficiente generación de especies citotóxicas y su obtención a través de un proceso de síntesis química simple y poco costoso. Por esta razón, aunque varias Pcs han sido evaluadas en ensayos clínicos en protocolos de TFD, hasta el momento no se ha investigado su eficacia terapéutica para el tratamiento del CCR. Una estrategia que podría aportar mejoras a la eficacia de la TFD es la incorporación de FSs en vehículos o *carriers*, como liposomas y micelas. Este enfoque, al reducir la dosis de FS requerida para alcanzar el mismo efecto, permite mejorar el índice terapéutico y la biocompatibilidad. Al mismo tiempo, se logra reducir la toxicidad y los efectos secundarios, por lo que el estudio de la potencia fototóxica de Pcs en vehículos apropiados resulta de especial interés.

Sobre la base de estos hechos, nuestra hipótesis de trabajo consiste en proponer a las Pcs de zinc(II) como agentes fototóxicos adecuados que permitan abordar una estrategia terapéutica efectiva para el tratamiento del CCR.

Resumen

Con el propósito de investigar la potencia fototóxica de Pcs lipofílicas, decidimos evaluar la eficacia de la ftalocianina 9 (Pc9) en una línea de células de adenocarcinoma orofaríngeo. Cuando se determinó la potencia de Pc9 disuelta en DMSO-agua se obtuvo un valor de IC_{50} de 120 nM, sin presentar toxicidad en la oscuridad. Sobre la base de este resultado, evaluamos luego si su capacidad fototóxica podía ser mejorada al ser incorporada en algún tipo de vehículo o *carrier*. Demostramos que Pc9 vehiculizada, ya sea en liposomas o micelas, induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares y se localiza principalmente en lisosomas. Asimismo, mientras que algunos de estos vehículos resultaron tóxicos *per se*, otros permitieron reducir el valor de IC_{50} , obteniendo la máxima potencia ($IC_{50} = 10$ nM) cuando Pc9 fue incorporada en las micelas de poloxamina denominadas T1107 y T1307. La mayor fotoestabilidad de Pc9 vehiculizada en T1107 con respecto a T1307 nos llevó a seleccionar la formulación Pc9-T1107 como la más potente y promisoría para continuar nuestros estudios.

Teniendo en cuenta la importancia epidemiológica tanto a nivel mundial como nacional del carcinoma colorrectal (CCR), decidimos en una etapa posterior evaluar la eficacia de la TFD con Pc9-T1107 en líneas humanas y murinas de CCR. Puesto que en las distintas líneas ensayadas se obtuvieron valores similares de IC_{50} en cultivos bidimensionales (aproximadamente 10 nM), seleccionamos la línea celular murina CT26 como modelo de CCR para investigar el mecanismo de acción antitumoral de Pc9. El motivo de esta decisión obedeció no solo a las capacidades adquiridas en el laboratorio para generar modelos celulares más complejos, como esferoides o cultivos 3D, sino también a la posibilidad de estudiar modelos *in vivo* de esta patología originados a partir de esta línea celular. El análisis de los eventos moleculares involucrados en el proceso de muerte desencadenado en cultivos 2D por Pc9-T1107 reveló que la generación de ROS en lisosomas y retículo endoplásmico (RE), las principales organelas donde se localizó Pc9 intracelularmente, promovió la activación de una serie de blancos moleculares. La permeabilización de la membrana lisosomal, inducida por las ROS, produjo la liberación de una serie de proteasas al citosol, entre ellas Catepsina D, que contribuyó al clivaje de la proteína pro-apoptótica Bid y la activación de la procaspasa iniciadora 8. La fotoactivación de Pc9 en el RE activó una respuesta denominada UPR (del inglés *unfolded protein response*), indicio de estrés del RE. La UPR se caracterizó por un aumento en los niveles de expresión de ciertas chaperonas (GRP78/BIP, Calnexina, Hsp90 y Hsp110) que tienden a mantener la homeostasis celular. Además, se describió un incremento en los niveles de calcio intracelular que desencadenó la activación de calpaínas. Estas proteasas, a su vez, clivaron la procaspasa 12, una enzima que contribuye a la activación de una respuesta apoptótica. Asimismo, la participación de la vía de apoptosis mitocondrial fue evidenciada por la reducción en el potencial de membrana de esta organela, la disminución en los niveles de expresión de

proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y la activación de procaspasa 9. La consiguiente activación de procaspasa 3 provocó el clivaje de PARP-1 y el desenlace apoptótico con daño a nivel nuclear. En paralelo, la TFD promovió alteraciones del ciclo celular, mediante arresto en la fase G₂/M y prolongación de la fase S, así como la activación de una respuesta macroautofágica tendiente a contrarrestar el efecto citotóxico de Pc9-T1107.

Es sabido que la eficacia de una terapia antitumoral en cultivos bidimensionales no implica necesariamente su efectividad en la clínica. Existen numerosos aspectos de un cultivo que resultan simplificaciones con respecto al contexto en un paciente. En consecuencia, resulta indispensable evaluar las terapias en fase preclínica en modelos celulares y animales más complejos que los cultivos 2D. Teniendo en cuenta estas consideraciones, demostramos que la TFD con Pc9-T1107 fue efectiva también en un cultivo tridimensional de células de carcinoma de colon CT26. El valor de IC₅₀ obtenido (370 nM) fue considerablemente mayor al valor previamente descrito en cultivos 2D (10 nM), indicando que en modelos más complejos se requieren mayores cantidades de FS para alcanzar el mismo efecto fototóxico. Demostramos también la inducción de un mecanismo de muerte celular apoptótico en los cultivos de esferoides de células CT26.

Finalmente, decidimos evaluar la terapia en un modelo aún más complejo, como es el modelo *in vivo*. En el trabajo con animales se añaden las complicaciones resultantes de la posible degradación de la formulación administrada por opsonización u otros procesos, la participación del sistema inmune, la biodistribución del FS, etc. Demostramos que la TFD con Pc9-T1107 en ratones Balb/c desafiados con células CT26 produjo un enlentecimiento significativo en la progresión del crecimiento tumoral, un incremento de áreas histológicamente necróticas en el tumor y un aumento en la sobrevida de los animales tratados. El tratamiento no generó toxicidad sistémica, ni en tejidos fisiológicamente relevantes, ni particularmente a nivel hepático. Además, se demostró que, al igual que en cultivos 2D y 3D, se desencadenó un mecanismo apoptótico de muerte celular.

En su conjunto, los resultados obtenidos demostraron que la TFD con Pc9-T1107 resultó un tratamiento eficaz y potente para el tratamiento del CCR tanto en modelos *in vitro* (bi y tridimensionales) como *in vivo* (ratones Balb/c). La caracterización realizada del mecanismo de muerte celular facilitará en un futuro la evaluación de terapias combinadas con otras alternativas que posibiliten potenciar la eficacia terapéutica de Pc9-T1107, entre las cuales podríamos mencionar el empleo de inhibidores de autofagia - que participa como un mecanismo de sobrevida -, el uso de moléculas que promuevan el estrés del RE, o el empleo de FSs que inicien el daño oxidativo en otra organela, como por ejemplo FSs de localización mitocondrial.

En conclusión, nuestros estudios nos permiten postular a la formulación Pc9-T1107 como un agente de potencial interés terapéutico que podría, en un futuro cercano, ser utilizado en ensayos clínicos dirigidos a combatir, de manera más eficiente, una de las enfermedades malignas gastrointestinales más usuales, como es el carcinoma colorrectal.

Bibliografía

2017 Cancer Staging Manual of the American Joint Committee on Cancer, 8th edition. *Springer*.

Abrahamse H., Kruger C.A., Kadanyo S., Mishra A. (2017) Nanoparticles for Advanced Photodynamic Therapy of Cancer. *Photomedicine and Laser Surgery* 35, 581-588.

Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. (2003) Amphiphilic Block Copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 1343-1355.

Agarwal M.L., Clay M.E., Harvey E.J, Evans H.H., Antunez A.R., Oleinick N.L. (1991) Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Research* 51, 5993-5996.

Aggarwal N., Sloane B.F. (2014) Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics, Clinical Applications* 8(0), 427-437.

Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., y col. (2011) Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(4), 250-281.

Ahmed D., Eide P.W., Eilertsen I.A., Danielsen S.A., Eknæs M., Hektoen M., y col. (2013) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogene* 2, 71.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robets K., Walter P. (2002) Molecular Biology of the cell, 4th edition. *Garland Science*.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A.D., Lewis J., Roberts K. (2014a) Essential Cell Biology, 4th edition. *Garland Science*.

Alberts B., Johnson A.D., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., y col (2014b) Molecular Biology of the Cell, 6th edition. *Garland Science*.

Al-Hajj M., Becker M.W., Wicha M., Weissman I., Clarke M.F. (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development* 14, 43-7.

Alléman E., Rousseau M., Brasseurs N., Kudrevich S.V., Lewis K., van Lier J.E. (1996) Photodynamic therapy of tumour with hexadecafluoro zinc phthalocyanine formulated in PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles. *International Journal of Cancer* 66, 821-824.

Allen T.M., Hansen C.B., Menenez D.E.L. (1995) Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16, 267-284.

Allison R.R., Bagnato V.S., Sibata C.H. (2010) Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncology* 6, 929-940.

Allison R.R., Sibata C.H. (2010) Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 7, 61-75.

Almanza A., Carlesso A., Chintia C., Creedican S., Doultisinos D., Leuzzi B., y col. (2018) Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS Journal*.

Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. (2004) Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1704, 59-86.

Alvarez-Lorenzo C., Rey-Rico A., Brea J., Loza M.I., Concheiro A., Sosnik A. (2010a) Inhibition of P-glycoprotein pumps by PEO-PPO amphiphiles: Branched versus linear derivatives. *Nanomedicine* 5, 1371-1383.

Alvarez-Lorenzo C., Rey-Rico A., Sosnik A., Taboada P., Concheiro A. (2010b) Poloxamine-based nanomaterials for drug delivery. *Frontiers in Biosciences* 1, 424-440.

Alvarez-Lorenzo C., Sosnik A., Concheiro A. (2011) PEO-PPO Block Copolymers for Passive Micellar Targeting and Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Therapy. *Current Drug Targets* 12, 1112-1130.

Ando H., Kawaai K., Bonneau B., Mikoshiba K. (2017) Remodeling of Ca²⁺ signaling in cancer: Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through oncogenes and tumor suppressors. *Advances in Biological Regulation* 68, 64-76.

Andrade V.A., Almeida A.C., Souza D.S., Colen K.G.F., Macêdo A.A., Martins E.R., y col. (2014) Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(12), 1153-1161.

Appelqvist H., Johansson A.C., Linderöth E., Johansson U., Antonsson B., Steinfeld R., y col. (2012) Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Annals of Clinical and Laboratory Science* Summer 42(3), 231-242.

Araki T., Liu N. (2018) Cell Cycle Regulators and Lineage-Specific Therapeutic Targets for Cushing Disease. *Frontiers in Endocrinology* 9, 444.

Aran V., Victorino A.P., Thuler L.C., Ferreira C.G. (2016) Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clinical Colorectal Cancer* 15, 195-203.

Aredia F., Scovassi A.I. (2014) Poly(ADP-ribose): A signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical Pharmacology* 92, 157-163.

Aston W.J., Hope D.E., Nowak A.K., Robinson B.W., Lake R.A., Lesterhuis W.J. (2017) A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice. *BMC Cancer* 17, 684.

Attia A.B.E., Oong Z.Y., Hedrick J.L., Lee P.P., Ee P.L.R., Hammond P.T. y col. (2011) Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 16, 182-194.

Ayaz F., Yuzer A., Ince M. (2018) Immunostimulatory effect of Zinc Phthalocyanine derivatives on macrophages based on the pro-inflammatory TNF α and IL1 β cytokine production levels. *Toxicology in Vitro* 53, 172-177.

Babbar N., Gerner E.W. (2011) Targeting Polyamines and Inflammation for Cancer Prevention. *Recent Results in Cancer Research* 188, 49-64.

Bacellar I.O.L., Tsubone T.M., Pavani C., Baptista M.S. (2015) Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 20523-20559.

Bailey C.E., Hu C.Y., You Y.N., Bednarski B.K., Rodriguez-Bigas M.A., Skibber J.M., y col. (2015) Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surgery* 150, 17-22.

Bandyopadhyay U., Kaushik S., Varticovski L., Cuervo A.M. (2008) The chaperone mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Molecular Cell Biology* 28, 5747-5763.

Basu A.K. (2018) DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 970.

Baxter P., Chen Y., Xu Y., Swanson R.A. (2014) Mitochondrial dysfunction induced by nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1: a treatable cause of cell death in stroke. *Translational Stroke Research* 5(1), 136-144.

Belicha-Villanueva A., Riddell J., Bangia N., Gollnick S.O. (2012) The Effect of Photodynamic Therapy on Tumor Cell Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class I-Related Molecules. *Lasers in Surgery and Medicine*.44(1), 60-68.

Bhave M.S., Hassanbhai A.M., Anand P., Luo K.Q., Teoh S.H. (2015) Effect of Heat-Inactivated Clostridium sporogenes and Its Conditioned Media on 3-Dimensional Colorectal Cancer Cell Models. *Scientific Reports* 5, 15681.

Blank M., Lavie G., Mandel M., Keisari Y. (2000) Effects of photodynamic therapy with hypericin in mice bearing highly invasive solid tumors. *Oncology Research* 12, 409-418.

Bobo D., Robinson K.J., Islam J., Thurecht K.J., Corrie S.R. (2016) Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research* 33(10), 2373-2387.

Boya P., Kroemer G. (2008) Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434-6451.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brattain M.G., Strobel-Stevens J., Fine D., Webb M., Sarraf A.M. (1980) Establishment of Mouse Colonie Carcinoma Cell Lines with Different Metastatic Properties. *Cancer Research* 40, 2142-2146.

Bronshteint I., Aulova S., Juzeniene A., Iani V., Ma L.W., Smith K.M., y col. (2006) In vitro and in vivo photosensitization by protoporphyrins possessing different lipophilicities and vertical localization in the membrane. *Photochemistry and Photobiology* 82(5), 1319-1325.

Brovko L. (2010) Advances in Food and Nutrition Research - Chapter 3 - Photodynamic Treatment: A New Efficient Alternative for Surface Sanitation. *Elsevier* 119-147.

Brown S.B., Brown E.A., Walker I. (2004) The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology* 5, 497-508.

Buytaert E., Callewaert G., Hendrickx N., Scorrano L., Hartmann D., Missiaen L., y col. (2006) Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB Journal* 20(6), 756-758.

Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1776(1), 86-107.

Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. (2007) Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 21, 293-302.

Canti G., Lattuada D., Nicolin A., Taroni P., Valentini G., Cubeddu R. (1994) Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. *Anticancer Drugs* 5, 443-447.

Cao S.S., Kaufman R.J. (2012) Unfolded protein response. *Current Biology* 22(16), 622-626.

Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry* 257, 7847-7851.

Castle J.C., Loewer M., Boegel S., de Graaf J., Bender C., Tadmor A.D., y col. (2014) Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics* 15, 190.

Cekanova M., Rathore K. (2014) Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy* 8, 1911-1922.

Celenk Kaya E., Durmus M., Yanmaz E., Kantekin H. (2014) Synthesis and spectral and thermal characterization of new metal-free and metallophthalocyanines: investigation of their photophysical, photochemical, and thin film properties. *Turkish Journal of Chemistry* 38, 1118-1134.

Chaitanya G.V., Alexander J.S., Babu P.P. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling* 8, 31.

Charoen K.M., Fallica B., Colson Y.L., Zaman M.H., Grinstaff M.W. (2014) Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. *Biomaterials* 35, 2264-2271.

Chen B., Pogue B.W., Hasan T. (2005) Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2(3), 477-487.

Chiappetta D.A., Sosnik A. (2007) Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66, 303-317.

Chiu S.M., Xue L.Y., Lam M., Rodriguez M.E., Zhang P., Kenney M.E., y col. (2010) A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology* 86, 1161-1173.

Cho K., Yoon S.Y., Choi J.E., Kang H.J., Jang H.Y., Kim D.H. (2013) CA-074Me, a Cathepsin B inhibitor, decreases APP accumulation and protects primary rat cortical neurons treated with okadaic acid. *Neuroscience Letters* 548, 222-227.

Ciou S.Y., Hsu C.C., Kuo Y.H., Chao C.Y. (2014) Effect of wild bitter gourd treatment on inflammatory responses in BALB/c mice with sepsis. *Biomedicine (Taipei)* 4, 7-13.

Cirman T., Oresic K., Mazovec G.D., Turk V., Reed J.C., Myers R.M., y col. (2004) Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3578-3587.

Collier N.J., Haylett A.K., Wong T.H., Morton C.A., Ibbotson S.H., McKenna K.E., y col. (2018) Conventional and combination topical photodynamic therapy for basal cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*.

Conus S., Perozzo R., Reinheckel T., Peters C., Scapozza L., Yousefi S., y col. (2008) Caspase-8 is activated by Cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 205(3), 685-698.

Cozzani I., Jori G., Bertoloni G., Milanese C., Carlini P., Sicuro T., y col. (1985) Efficient photosensitization of malignant human cells in vitro by liposome-bound porphyrins. *Chemico-Biological Interactions* 53, 131-143.

Cuervo A.M., Dice J.F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-503.

Cuestas M.L., Sosnik A., Mathet V.L. (2011) Poloxamines display a multiple inhibitory activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer cell lines. *Molecular Pharmacology* 8, 1152-1164.

Curry B. (2001) Animal Models Used in Identifying Gender-Related Differences. *International Journal of Toxicology* 20,153-160.

Curry P.M., Levy J.G. (1993) Stress protein expression in murine tumor cells following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *Photochemistry and Photobiology* 58(3), 374-379.

Dalton S, Coverdell P.D. (2015) Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends in Cell Biology* 25(10), 592–600.

Daniel N.N., Korsmeyer S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Day C., Merlino G., Van Dyke T. (2015) Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. *Cell* 163(1), 39-53.

Demidenko E. (2010) Three endpoints of in vivo tumour radiobiology and their statistical estimation. *International Journal of Radiation Biology* 86(2), 164-173.

Desoize B., Jardillier J. (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36, 193-207.

Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. (2004) *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 3897-3915.

Diamond I., Granelli S.G., McDonagh A.F., Nielsen S., Wilson C.B., Jaenicke R. (1972) Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet* 2, 1175-1177.

DiGiovanni, J. (1992) Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology and Therapeutics* 54, 63-128.

Dobkowski W.B., Murkin J.M. (1998) A risk-benefit assessment of aprotinin in cardiac surgical procedures. *Drug Safety* 18(1), 21-41.

Dokladny K., Myers O.B., Moseley P.L. (2015) Heat shock response and autophagy-cooperation and control. *Autophagy* 11(2), 200-213.

Doleman B., Mills K.T., Lim S., Zelhart M.D., Gagliardi G. (2016) Body mass index and colorectal cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Techniques in Coloproctology* 20, 517-535.

Dougherty T.J., Grindey G.B., Weishaupt K.R., Boyle D. (1975) Photo-radiation therapy II. Cure of animal tumours with haematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute* 55, 115-121.

Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittlemen A. (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumours. *Cancer Research* 38, 2628-2635.

Dougherty T.J. (1987) Photosensitizers, therapy and detection of malignant tumors. *Photochemistry and Photobiology* 45, 879-889.

Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korblik M., y col. (1998) Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 90, 889-905.

Doulias P.T., Kotoglou P., Tenopoulou M., Keramisanou D., Tzavaras T., Brunk U., y col. (2007) Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radical Biology and Medicine* 42(4), 567-577.

Droga-Mazovec G., Bojic L., Petelin A., Ivanova S., Romih R., Repnik U., y col. (2008) Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *Journal of Biological Chemistry* 283(27), 19140-19150.

Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R.K. (2011) The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* 40, 340-362.

Evans J.P., Sutton P.A., Winiarski B.K., Fenwick S.W., Malik H.Z., Vimalachandran D., y col. (2016) From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 98, 94-105.

Fabris C., Valduga G., Miotto G., Borsetto L., Jori G., Garbisa S., y col. (2001) Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Research* 61(20), 7495-4500.

Fakayode O.J., Tsolekile N., Songca S.P., Oluwafemi O.S. (2018) Applications of functionalized nanomaterials in photodynamic therapy. *Biophysical Reviews* 10, 49-67.

Favoriti P., Carbone G., Greco M., Pirozzi F., Pirozzi R.E., Corcione F. (2016) Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in Surgery* 68, 7-11.

Ferguson L.R. (2009) Role of dietary mutagens in cancer and atherosclerosis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12(4), 343-349.

Ferrario A., Corner C.J. (1990) Systemic Toxicity in Mice Induced by Localized Porphyrin Photodynamic Therapy. *Cancer Research* 50, 539-543.

Foster I. (2008) Cancer: a cell cycle defect. *Radiography* 14, 144-149.

Frese K.K., Tuveson D.A. (2007) Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer* 7, 645-658.

Friedrich J., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. (2007) Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology* 83(11-12), 849-871.

Friedrich J., Siedel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols* 4, 309-324.

Froehlich K., Haeger J., Heger J., Pastuschek J., Photini S., Yan Y., y col. (2016) Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 21(3-4), 1-10.

Fujiki H., Mori M., Nakayasu M., Terada M., Sugimura T., Moore R.E. (1981) Indole alkaloids: Dihydrateleocidin B, teleocidin, and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *PNAS* 78, 3872-3876.

Fujiki H., Sugimura T. (1987) New classes of tumor promoters: Teleocidin, aplysiatoxin, and palytoxin. *Advanced Cancer Research* 49, 223-264.

Fujishiro T., Nonoguchi N., Pavliukov M., Ohmura N., Park Y., Kajimoto Y., y col. (2018) 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* S1572-1000(18)30185-6.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., y col. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* 19, 107-120.

Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M., Cecconi F., y col. (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* 36(13), 1811-1836.

Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., y col. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation* 25, 486–541.

García A.M., Alarcón E., Muñoz M., Scaiano J.C., Edwards A.M., Lissi E. (2011) Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10, 507-514.

García V., Lara-Chica M., Cantarero I., Sterner O., Calzado M.A., Muñoz E. (2016) Galiellalactone induces cell cycle arrest and apoptosis through the ATM/ATR pathway in prostate cancer cells. *Oncotarget* 7(4), 4490-5506.

García de la Cadena S., Massieu L. (2016) Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. *Apoptosis* 21(7), 763-777.

García Vior M.C., Marino J., Roguin L.P., Sosnik A., Awruch J. (2013) Photodynamic effects of zinc(II) phthalocyanine-loaded polymeric micelles in human nasopharynx KB carcinoma cells. *Photochemistry and Photobiology* 89, 492-500.

Gariboldi M.B., Ravizza R., Baranyai P., Caruso E., Banfi S., Meschini S. y col. (2009) Photodynamic effects of novel 5,15-diaryl-tetrapyrrole derivatives on human colon carcinoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 2009-2016.

Gauna G.A., Marino J., García Vior M.C., Roguin L.P., Awruch J. (2011) Synthesis and comparative photodynamic properties of two isosteric alkyl substituted zinc(II) phthalocyanines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 5532-5539.

Gibson S.L., van der Meid K.R., Murant R.S., Hilf R. (1990) Increased efficacy of photodynamic therapy of R3230AC mammary adenocarcinoma by intratumoral injection of photofrin II. *British Journal of Cancer* 61, 553-557.

Gil M., Bieniasz M., Seshadri M., Fisher D., Ciesielski M.J., Chen Y., y col. (2011) Photodynamic therapy augments the efficacy of oncolytic vaccinia virus against primary and metastatic tumours in mice. *British Journal of Cancer* 105, 1512-1521.

Giorgio V., Guo L., Bassot C., Petronilli V., Bernardi P. (2018) Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium* 70, 56-63.

Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R., Merchuk J.C., Cohen S. (2000) Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 67(3), 344-353.

Gold B. (2017) Somatic mutations in cancer: Stochastic versus predictable. *Mutation Research* 814, 37-46.

Golovko D., Kedrin D., Yilmaz O.H., Roper J. (2015) US Spelling Colorectal cancer models for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 10(11), 1217-1229.

Gomes A.T.P.C., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S. (2018) Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 90(1,2), 993-1026.

Gonzalez-López J., Alvarez-Lorenzo C., Taboada P., Sosnik A., Sandez-Macho I., Concheiro A. (2008) Self-associative behavior and drug-solubilizing of poloxamine (Tetronic) block copolymers. *Langmuir* 24, 10688–10697.

González-Ponce H.A., Rincón-Sánchez A.R., Jaramillo-Juárez F., Moshage H. (2018) Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Nutrients* 10, 117.

Gopalakrishna R., Schiffman J., Roth B., Gottlieb S., Gundimeda U. (2008) Tumor promoter benzoyl peroxide induces direct oxidative activation of protein kinase C ϵ and increases phosphorylation of STAT3. *Cancer Research*, 68(9), 3135.

Green D.R., Oberst A., Dillon C.P., Weinlich R., Salvesen G.S. (2011). RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases: a mystery in five acts. *Molecular Cell* 44, 9-16.

Green D.R., Llambi F. (2015) Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(12), a006080.

Grutter M.G. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 649-655.

Gugliucci A., Ranzato L., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Cusan C., y col. (2002) Mitochondria are direct targets of the lipoxygenase inhibitor MK886. A strategy for cell killing by combined treatment with MK886 and cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 277(35), 31789-31795.

Guicciardi M.E., Leist M., Gores G.J. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23, 2881-2890.

Guzinska-Ustymowicz K., Pryczynicz A., Kemon A., Cczyzewska J. (2009) Correlation between Proliferation Markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and Antiapoptotic Protein Bcl-2 in Colorectal Cancer. *Anticancer Research* 29, 3049-3052.

Haddad R., Kaplan O., Greenberg R., Siegal A., Skornick Y., Kashtan H. (2000) Photodynamic therapy of murine colon cancer and melanoma using systemic aminolevulinic acid as a photosensitizer. *International Journal of Surgical Investigation* 2(3),171-178.

Haggar F.A., Boushey R.P. (2009) Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 22, 191-197.

Hall A.P., Elcombe C.R., Foster J.R., Harada T., Kaufmann W., Knippel A., y col. (2012) Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes - Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology* 40, 971-994.

Hamblin M.R., Mróz P. (2008) Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical, 1st edition. *Engineering in Medicine & Biology*.

Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5), 646-674.

Hassa P.O., Hottiger M.O. (2008) The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Frontiers in Bioscience* 13, 3046-3082.

Hatakeyama T., Murayama Y., Komatsu S., Shiozaki A., Kuriu Y., Ikoma H., y col. (2013) Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncology Reports* 29, 911-916.

Haywood-Small S.L., Vernon D.I., Griffiths J., Schofield J., Brown S.B. (2006) Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339, 569-576.

Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., y col. (2004) Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differentiation* 11, 550-563.

Henderson B.W., Dougherty T.J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* 55, 145-157.

Hendrickx N., Dewaele M., Buytaert E., Marsboom G., Janssens S., van Boven M., y col. (2005) Targeted inhibition of p38alpha MAPK suppresses tumor-associated endothelial cell migration in response to hypericin-based photodynamic therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337(3), 928-935.

Hengartner M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Hetz C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(2), 89-102.

Hoorelbeke D., Decrock E., Van Haver V., De Bock M., Leybaert L. (2018) Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy? *Biochimica et Biophysica Acta* 18, 30232-30235.

Huang Y., Balasubramanian T., Yang E., Luo D., Diers J.R., Bocian D.F., y col. (2012) Stable Synthetic Bacteriochlorins for Photodynamic Therapy: Role of Dicyano Peripheral Groups, Central Metal Substitution (2H, Zn, Pd), and Cremophor EL Delivery. *ChemMedChem* 7(12), 2155-2167.

Ichinose S., Usuda J., Hirata T., Inoue T., Ohtani K., Maehara S., y col. (2006) Lysosomal Cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). *International Journal of Oncology* 29(2), 349-355.

Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., y col. (2015) Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports* 33(4), 1837-1843.

International Agency for Research in Cancer (<https://www.iarc.fr/>).

Ismail R., Allaudin Z.N., Abdullah R., Lila M.M., Rahman N.N.A., Rahman S.A. (2016) Combination of VP3 and CD147-knockdown enhance apoptosis and tumor growth delay index in colorectal tumor allograft. *BMC Cancer* 16, 461.

Jackson E.L., Lua H. (2016) Three-dimensional models for studying development and disease: moving on from organisms to organs-on-a-chip and organoids. *Integrative Biology* 8(6), 672-683.

Jacob J.A., Salmani J.M.M., Jiang Z., Feng L., Song J., Jia X. y col. (2017) Autophagy: An overview and its roles in cancer and obesity. *Clinica Chimica Acta* 468, 85-89.

Jalili A., Makowski M., Switaj T., Nowis D., Wilczynski G.M., Wilczek E., y col. (2004) Effective Photoimmunotherapy of Murine Colon Carcinoma Induced by the Combination of Photodynamic Therapy and Dendritic Cells. *Clinical Cancer Research* 10, 4498-4508.

Jiang Z., Shao J., Yang T., Wang J., Jia L. (2014) Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 87, 98-104.

Johansson A.C., Steen H., Ollinger K., Roberg K. (2003) Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death and Differentiation* 10, 1253-1259.

Johansson A.C., Appelqvist H., Nilsson C., Kågedal K., Roberg K., Ollinger K. (2010) Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis* 15, 527-540.

Juarez A.V., del V. Sosa L., De Paul A.L., Costa A.P., Farina M., Leal R.B., y col. (2015) Riboflavin acetate induces apoptosis in squamous carcinoma cells after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 153, 445-454.

Kabanov A.V., Lemieux P., Vinogradov S., Alakhov V. (2002) Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 223-233.

Kågedal K., Johansson U., Ollinger K. (2001) The lysosomal protease Cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB Journal* 15, 1592-1594.

Kahraman E., Karagoz A., Dincer S., Oozsoy Y. (2015) Polyethylenimine modified and non-modified polymeric micelles used for nasal administration of carvedilol. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 11, 890-899.

Kakizawa Y., Kataoka K. (2002) Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 203-222.

Kaminsky V., Zhivotovsky B. (2012) Proteases in autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824(1), 44-50.

Kashtan H., Haddad R., Yossiphov Y., Bar-On S., Skornick Y. (1996) Photodynamic therapy of colorectal cancer using a new light source: from in vitro studies to a patient treatment. *Diseases of the Colon and Rectum* 39(4), 379-383.

Kaufmann S.H., Hengartner M.O. (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 11, 526-534.

Kawczyk-Krupka A., Bugaj A.M., Latos W., Zaremba K., Wawrzyniec K., Sieroń A. (2015) Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: the state of the art in clinical trials, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 12, 545-553.

Kawczyk-Krupka A., Bugaj A.M., Latos W., Zaremba K., Wawrzyniec K., Kucharzewski M., y col. (2016) Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment-the state of the art in preclinical research. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13, 158-174.

Kemp C.J. (2015) Animal Models of Chemical Carcinogenesis: Driving Breakthroughs in Cancer Research for 100 Years. *Cold Spring Harbor Protocols* 10, 865-874.

Kessel D. (2004) Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 8, 1009-1014.

Kessel D. (2018) Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*.

Kessel D., Oleinick N.L. (2018) Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochemistry and Photobiology* 94, 213-218.

Khot M.I., Perry S.L., Maisey T., Armstrong G., Andrew H., Hughes T.A., y col. (2018) Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the efficacy of hypericin-mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of colorectal cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 23, 221-229.

Kim Y.W., Bae S.M., Liu H.B., Kim I.W., Chun H.J., Ahn W.S. (2012) Selenium enhances the efficacy of Radachlorin mediated-photodynamic therapy in TC-1 tumor development. *Oncology Reports* 28, 576-584.

Kohler B.A., Ward E., McCarthy B.J., Schymura M.J., Ries L.A., Ehemann C., y col. (2011) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *Journal of the National Cancer Institute* 103, 714-736.

Kolligs F.T. (2016) Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visceral Medicine* 32, 158-164.

Konan Y.N., Gurny R., Allémann E. (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66, 89-106.

Konan Y.N., Berton M., Gurny R., Allémann E. (2003) Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 18, 241-249.

Korbelik M. (1996) Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery* 14, 329-334.

Korbelik M., Krosi G., Krosi J., Dougherty, G.J. (1996) The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Research* 56, 5647-5652.

Korbelik M., Sun J., Zeng H. (2003) Ischaemia-reperfusion injury in photodynamic therapy-treated mouse tumours. *British Journal of Cancer* 88, 760-766.

Kou J., Dou D., Yang L. (2017) Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* 8(46): 81591-81603.

Krieg R.C., Messmann H., Schlottmann K., Endlicher E., Seeger S., Schölmerich J., y col. (2003) Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study *Photochemistry and Photobiology* 78, 393-399.

Kudarha R.R., Sawant K.K. (2017) Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications* 81, 607-626.

Kuzyniak W., Ermilov E.A., Atilla D., Gürek A.G., Nitzsche B., Derkow K., y col. (2016) Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13, 148-157.

Kwon G., Suwa S., Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. (1994) Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly (ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates. *Journal of Controlled Release* 29, 17-23.

Kwon G.S. (2003) Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 20, 357-403.

Lam S., Crofton C., Cory P. (1996) Combined Photodynamic Therapy (PDT) using Photofrin and radiotherapy (XRT) versus radiotherapy alone in patients with inoperable distribution non-small cell bronchogenic cancer. *Proceedings of SPIE* 1616, 20-28.

Lamch L., Bazylińska U., Kulbacka J., Pietkiewicz J., Biezunska-Kusiak K., Wilk K.A. (2014) Polymeric micelles for enhanced PhotofrinII® delivery, cytotoxicity and pro-apoptotic activity in human breast and ovarian cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 11, 570-585.

Lamch L., Kulbacka J., Pietkiewicz J., Rossowska J., Dubińska-Magiera M., Choromańska A., y col. (2016) Preparation and characterization of new zinc(II) phthalocyanine-containing poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymer micelles for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 160, 185-197.

Landegren U. (1984) Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *Journal of Immunological Methods* 67, 379-388.

Leach M.W., Peaston A.E. (1994) Adverse Drug Reaction Attributable to Aluminum Phthalocyanine Tetrasulphonate Administration in Domestic Cats. *Veterinary Pathology* 31, 283-287.

Lee C.H., Lai P.S., Lu Y.P., Chen H.Y., Chai C.Y., Tsai R.K., y col. (2015) Real-time vascular imaging and photodynamic therapy efficacy with micelle-nanocarrier delivery of chlorin e6 to the microenvironment of melanoma. *Journal of Dermatological Sciences* 80(2) 124-132.

Lee H. (2014) Genetically engineered mouse models for drug development and preclinical trials. *Biomolecules and Therapy* 22, 267-274.

Lemons J.M.S., Feng X., Bennett B.D., Legesse-Miller A., Johnson E.L., Raitman I., y col. (2010) Quiescent Fibroblasts Exhibit High Metabolic Activity. *PLoS Biology* 8(10), e1000514.

Letchford K., Burt H. (2007) A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65, 259-269.

Levine J.S., Ahnen D.J. (2006) Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *New England Journal of Medicine* 355, 2551-2557.

Levy J.G., Obochi M. (1996) New applications in photodynamic therapy introduction. *Photochemistry and Photobiology* 64, 737-739.

Levy M.A., Lovly C.M., Pao W. (2012) Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm. *Genome Research* 22(11), 2101-2108.

Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li H., Liu C., Zeng Y.P., Hao Y.H., Huang J.W., Yang Z.Y., y col. (2016) Nanoceria-Mediated Drug Delivery for Targeted Photodynamic Therapy on Drug-Resistant Breast Cancer. *ACS Applied Materials and Interfaces* 8, 31510-31523.

Li K., Qiu L., Liu Q., Lv G., Zhao X., Wang S., y col. (2017) Conjugate of biotin with silicon(IV) phthalocyanine for tumor-targeting photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 174, 243-250.

Li Y., Du Y., Liang X., Sun T., Xue H., Tian J., y col. (2018) EGFR-targeted liposomal nanohybrid cerasomes: theranostic function and immune checkpoint inhibition in a mouse model of colorectal cancer. *Nanoscale* 10(35), 16738-16749.

Lian T., Ho R.J.Y. (2001) Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(6), 667-680.

Liaudet-Coopman E., Beaujouin M., Derocq D., Garcia M., Glondou-Lassis M., Laurent-Matha V., y col. (2006) Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Letters* 237, 167-179.

Lightdale C.J., Heier S.K., Marcon N.E., McCoughan J.S.Jr., Gerdes H., Overholt B.F., y col. (1995) Photodynamic therapy with porfimer sodium versus thermal ablation therapy with

Nd:YAG laser for palliation of esophageal cancer: a multicenter randomized trial. *Gastrointestinal Endoscopy* 42, 507-512.

Lin R., Chang H. (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* 3(9-10),1172-1184.

Lin S., Yeh T., Kuo C., Song J., Cheng M., Liao F., y col. (2016) Phenyl Benzenesulfonylhydrazides Exhibit Selective Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibition with Potent in Vivo Pharmacodynamic Activity and Antitumor Efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 419-430.

Liu D., Yin H., Zhang M. (2013) Signaling Pathways Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Apoptosis. *International Journal of Neuroscience* 123(3), 155-162.

Liu J., Zheng L., Li Y., Zhang Z., Zhang L., Shen L., y col (2015). Effect of DTPP-mediated photodynamic therapy on cell morphology, viability, cell cycle, and cytotoxicity in a murine lung adenocarcinoma cell line. *Lasers in Medical Science* 30, 181-191.

Liu J., Jin C., Yuan B., Chen Y., Liu X., Jia L., y col. (2017) Enhanced cancer therapy by marriage of metabolic alteration and mitochondrial-targeted photodynamic therapy using cyclometalated Ir(III) complexes. *Chemical Communications* 53(71), 9878-9881.

López Zeballos N.C., Marino J., García Vior M.C., Chiarante N., Roguin L.P., Awruch J. y col. (2013) Photophysics and photobiology of different liposomal formulations of 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis[(2dimethylamino)ethylsulfanyl] phthalocyaninato-zinc(II). *Dyes Pigments* 96, 626-635.

Lu J.W., Ho Y.J., Ciou S.C., Gong Z. (2017) Innovative Disease Model: Zebrafish as an In Vivo Platform for Intestinal Disorder and Tumors. *Biomedicines* 5(4), E58.

Lu M., Lawrence D.A., Marsters S., Acosta-Alvear D., Kimmig P., Mendez A.S. y col. (2014) Opposing unfolded protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science* 345(6192), 98-101.

Luo K., Cao S.S.(2015) Endoplasmic Reticulum Stress in Intestinal Epithelial Cell Function and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research and Practice* ID 328791.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Luo Y., Chang C.K., Kessel D. (1996) Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 63(4), 528-534.

Manigat R., Allix F., Frocho C., Claude André J. (2012) Preventing Societal Health Risks Emerging in the Development Of Nanomedicine - What Should Prevail? Risk Management for the Future - Theory and Cases. *IntechOpen*.

Marchal S., Fadloun A., Maugain E., D'Hallewin M., Guillemin F., Bezdetnaya L. (2005) Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan1 photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochemical Pharmacology* 69, 1167-1176.

Marino J., García Vior M.C., Dicelio L.E., Roguin L.P., Awruch J. (2010) Photodynamic effects of isosteric water-soluble phthalocyanines on human nasopharynx KB carcinoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 4129-4139.

Marino J., García Vior M.C., Furmento V., Blank V., Awruch J., Roguin L.P. (2013) Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45, 2553-2562.

Martini G., Troiani T., Cardone C., Vitiello P., Sforza V., Ciardiello D., y col. (2017) Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets. *World Journal of Gastroenterology* 23(26), 4675-4688.

Master A.M., Rodriguez M.E., Kenney M.E., Oleinick N.L., Sen Gupta A. (2010) Delivery of the photosensitizer Pc 4 in PEGPCL micelles for in vitro PDT studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, 2386-2389.

McIntyre R.E., Buczacki S.J.A., Arends M.J., Adams D.J. (2015) Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays* 37, 909-920.

Medico E., Russo M., Picco G., Cancelliere C., Valtorta E., Corti G. (2015) The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. *Nature Communications* 6, 7002.

Meeran S.M., Katiyar S.K. (2008) Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Frontiers in Bioscience* 13, 2191-2202.

Mehta G., Hsiao A.Y., Ingram M., Luker G.D., Takayama S. (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release* 164(2), 192-204.

Merchant S., Huang N., Korbelik M. (2010) Expression of complement and pentraxin proteins in acute phase response elicited by tumor photodynamic therapy: the engagement of adrenal hormones. *International Immunopharmacology* 10, 1595-1601.

Mesquita M.Q., Dias C.J., Gamelas S., Fardilha M., Neves M.G.P.M.S., Faustino M.A.F. (2018) An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for Photodynamic Therapy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90(1 Suppl. 2), 1101-1130.

Michael B., Yano B., Sellers R.S., Perry R., Morton D., Roome N., y col. (2007) Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. *Toxicologic Pathology* 35, 742-750.

Miller J.D., Baron E.D., Scull H., Hsia A., Berlin J.C., McCormick T., y col. (2007) Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 224, 290-299.

Mion G., Gianferrara T., Bergamo A., Gasser G., Pierroz V., Rubbiani R., y col. (2015) Phototoxic Activity and DNA Interactions of Water-Soluble Porphyrins and Their Rhenium(II) Conjugates. *ChemMedChem* 10, 1901-1914.

Moghissi K., Dixon K., Gibbins S. (2015) A Surgical View of Photodynamic Therapy in Oncology: A Review. *The Surgery Journal* 1(1), 1-15.

Moretton M.A., Hocht C., Taira C., Sosnik A. (2014) Rifampicin-loaded “flower-like” polymeric micelles for enhanced oral bioavailability in an extemporaneous liquid fixed-dose combination with isoniazid. *Nanomedicine* 9, 1635-1650.

Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T., Yasuhiko Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry* 277, 34287-34294.

Moseroval I., Kralova J. (2012) Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS One* 7(3), e32972.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.

Mouradov D., Sloggett C., Jorissen R.N., Love C.G., Li S., Burgess A.W., Arango D. (2014) Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Research* 74(12), 3238-3247.

Nagelkerke A., Bussink J., Sweep F.C., Span P.N. (2013) Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: how to go three-dimensional. *Analytical Biochemistry* 437(1), 17-19.

Naghavi N., Baygi M.H., Sazgarnia A. (2010) Determination of time-dependent protoporphyrin IX concentration for photodynamic therapy dosimetry in a mice colon tumor model using fluorescence spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 64(12), 1350-1354.

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., et al. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 403, 98-103.

Namikawa T., Yatabe T., Inoue K., Shuin T., Hanazaki K. (2015) Clinical applications of 5-aminolevulinic acid-mediated fluorescence for gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 21, 8769-8775.

National Cancer Institute at National Institute of Health, EEUU (<https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci>).

Ndoye A., Weeraratna A.T. (2016) Autophagy- An emerging target for melanoma therapy. *F1000Research* 5(F1000 Faculty Rev), 1888.

Nishikawa M., Hashida M. (2002) Noviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 275-283.

Nogueira E., Loureiro A., Nogueira P., Freitas J., Almeida C.R., Harmark J., y col. (2013) Liposome and protein based stealth nanoparticles. *Faraday Discussions* 166, 417.

Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Høyer-Hansen M., y col. (2004) Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Experimental Medicine* 200, 425-435.

Nyokong T., Antunes E. (2010) Photochemical and photophysical properties of metallophthalocyanines, The Handbook of Pophyrin Science. 247-357. *Academic Press*.

Oakes S.A., Papa F.R. (2015) The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology* 10, 173-194.

Ogawara K., Higaki K. (2017) Nanoparticle-Based Photodynamic Therapy: Current Status and Future Application to Improve Outcomes of Cancer Treatment. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 65, 637-641.

Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1, 1-21.

Olive K.P., Jacobetz M.A., Davidson C.J., Gopinathan A., McIntyre D., Honess D., Madhu B., y col. (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461.

Oliveira C.S., Turchiello R., Kowaltowski A.J., Indig G.L., Baptista M.S. (2011) Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 824-833.

Oliveira Freitas E., Nico D. , Alves-Silva M.C., Morrot A., Clinch K. , Evans G.B., y col. (2015) Immucillins ImmA and ImmH Are Effective and Non-toxic in the Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(12), e0004297.

Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 552-565.

Pandey R.K. (2000) Recent advances in photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 4, 368-373.

Park K. (2014) The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back. *Journal of Controlled Release* 190, 3-8.

Paschos K.A., Canovas D., Bird N.C. (2009) The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signaling* 21, 665-674.

Patel N.R., Aryasomayajula B., Abouzeid A.H., Torchilin V.P. (2015) Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. *Therapeutic Delivery* 6(4), 509-520.

Patil H., Saxena S.G., Barrow C.J., Kanwar J.R., Kapat A., Kanwar R.K. (2017) Chasing the personalized medicine dream through biomarker validation in colorectal cancer. *Drug Discovery Today* 22, 111-119.

Pelt J., Busatto S., Ferrari M., Thompson E.A., Mody K., Wolfram J. (2018) Chloroquine and nanoparticle drug delivery: A promising combination. *Pharmacology and Therapeutics* S0163-7258(18)30109-8.

Peng J., Zhao L., Zhu X., Sun Y., Feng W., Gao Y., y col. (2013) Hollow silica nanoparticles loaded with hydrophobic phthalocyanine for near-infrared photodynamic and photothermal combination therapy. *Biomaterials* 34, 7905-7912.

Pereira P.M.R., Carvalho J.J., Silva S., Cavaleiro J.A.S., Schneider R.J., Fernandes R., y col. (2014a). Porphyrin conjugated with serum albumins and monoclonal antibodies boosts efficiency in targeted destruction of human bladder cancer cells. *Organic and Biomolecular Chemistry* 12, 1804-1811.

Pereira P.M.R., Silva S., Cavaleiro J.A.S., Ribeiro C.A.F., Tome J.P.C., Fernandes R. (2014b) Galactodendritic Phthalocyanine Targets Carbohydrate Binding Proteins Enhancing Photodynamic Therapy. *PLoS One* 9(4), e95529.

Peters D.C., Noble S. (1999) Aprotinin: an update of its pharmacology and therapeutic use in open heart surgery and coronary artery bypass surgery. *Drugs* 57(2), 233-260.

Petersen N.H., Kirkegaard T. (2010) HSP70 and lysosomal storage disorders: novel therapeutic opportunities. *Biochemical Society Transactions* 38, 1479-1483.

Petersen N.H., Kirkegaard T., Olsen O.D., Jäättelä M. (2010) Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. *Cell Cycle* 9, 2305-2309.

Pinto-Alphandary H., Andremont A., Couvreur P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and implications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13, 155-168.

Postigo F., Mora M., De Madariaga M.A., Nonell S., Sagristá M.L. (2004) Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. *International Journal of Pharmaceutics* 278, 239-254.

Pucelik B., Gürol I., Ahsen V., Dumoulin F., Dąbrowski J.M. (2016) Fluorination of phthalocyanine substituents: Improved photoproperties and enhanced photodynamic efficacy after optimal micellar formulations. *European Journal of Medicinal Chemistry* 124, 284-298.

Raab O. (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biol.* 39, 524-546.

Rao M., Alving C.R. (2000) Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 41, 171-188.

Rao R.V., Castro-Obregon S., Frankowski H., Schuler M., Stoka V., del Rio G., y col. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1- independent intrinsic pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21836-21842.

Reiners J.J.Jr., Caruso J.A., Mathieu P., Chelladurai B., Yin X.M., Kessel D. (2002) Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death and Differentiation* 9, 934-944.

Repnik U., Stoka V., Turk V., Turk B. (2012) Lysosomes and lysosomal Cathepsins in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824(1), 22-33.

Ribeiro A., Sosnik A., Chiappetta D.A., Veiga F., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C. (2012) Single and mixed poloxamine micelles as nanocarriers for solubilization and sustained release of ethoxzalamide for topical glaucoma therapy. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 2059-2069.

Richter A.M., Waterfield E., Jain A.K., Canaan J.A., Allison B.A., Levy J.G. (1993) Liposomal delivery of a photosensitizer benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model. *Photochemistry and Photobiology* 57, 1000-1006.

Rijcken C.J.F., Hofman J.W., van Zeeland F., Hennink W.E., van Nostrum C.F. (2007) Photosensitizer-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, characterization and in vitro PDT efficacy. *Journal of Controlled Release* 124, 144-153.

Roberg K., Johansson U., Ollinger K. (1999) Lysosomal release of Cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 1228-1237.

Rodríguez M.E., Zhang P., Azizuddin K., de los Santos G.B., Chiu S., Xue L., y col. (2009) Structural factors and mechanisms underlying the improved photodynamic cell killing with silicon phthalocyanine photosensitizers directed to lysosomes versus mitochondria. *Photochemistry and Photobiology* 85, 1189-1200.

Rodríguez-Hernández A., Brea-Calvo G., Fernández-Ayala D.J., Cordero M., Navas P., Sánchez-Alcázar J.A. (2006) Nuclear caspase-3 and caspase-7 activation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 131-139.

Rong P., Yang K., Srivastan A., Kiesewetter D.O., Yue X., Wang F., y col. (2014) Photosensitizer Loaded Nano-Graphene for Multimodality Imaging Guided Tumor Photodynamic Therapy. *Theranostics* 4(3), 229-239.

Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. (2000) Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunology and Cell Biology* 78, 452-464.

Ruggeri B.A., Camp F., Miknyoczki S. (2014) Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical Pharmacology* 87, 150-161.

Salvatore L., Aprile G., Arnoldi E., Aschele C., Carnaghi C., Cosimelli M., y col. (2017) Management of metastatic colorectal cancer patients: guidelines of the Italian Medical Oncology Association (AIOM). *ESMO Open* 2, e000147.

Sanovic R., Verwangerb T., Hartl A., Krammerb B. (2011) Low dose hypericin-PDT induces complete tumor regression in BALB/c mice bearing CT26 colon carcinoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 8, 291-296.

Satonaka H., Kusuzaki K., Matsubara T., Shintani K., Nakamura T., Matsumine A., y col. (2010) In vivo anti-tumor activity of photodynamic therapy with intravenous administration of acridine orange, followed by illumination with high-power flash wave light in a mouse osteosarcoma model. *Oncology Letters* 1, 69-72.

Schröder M., Kaufman R.J. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research* 569(1-2), 29-63.

Sebolt-Leopold J.S. (2018) Development of Preclinical Models to Understand and Treat Colorectal Cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 31(03), 199-204.

Sekkat N., van den Bergh H., Nyokong T., Lange N. (2012) Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. *Molecules* 17, 98-144.

Sellera F.P., Sabino C.P., Hamblin M.R. (2016) History of PDT. Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice, Chapter 1. *Springer*.

Sharma A., Houshyar R., Bhosale P., Choi J., Gulati R., Lall C. (2014) Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. *Clinical and Molecular Hepatology* 20, 317-326.

Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E. (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* 11, 507-517.

Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E. (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in Enzymology* 319, 376-400.

Shinagawa T., Tanaka T., Nozawa H., Emoto S., Muroto K., Kaneko M., y col. (2018) Comparison of the guidelines for colorectal cancer in Japan, the USA and Europe. *Annals of Gastroenterological Surgery* 2, 6-12.

Silva Z.S., Bussadori S.K., Fernandes K.P.S., Huang Y., Hamblin M.R. (2015) Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience Reports* 35, e00265.

Singh D., Cho W.C., Upadhyay G. (2016) Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. *Frontiers in Physiology* 6, 363.

Skidan I., Dholakia P., Torchilin V. (2008) Photodynamic therapy of experimental B-16 melanoma in mice with tumor-targeted 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin-loaded PEG-PE micelles. *Journal of Drug Targeting* 16, 486-493.

Sneider A., Jadia R., Piel B., Vandyke D., Tsiros C., Rai P. (2017) Engineering remotely triggered liposomes to target triple negative breast cancer. *Oncomedicine* 2, 1-13.

Solaki M., Ewald J.C. (2018) Fueling the Cycle: CDKs in Carbon and Energy Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6, 93.

Song Q., Merajver S.D., Li J.Z. (2015) Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Human Genomics* 9, 27.

Spikes J.D. (1983) A preliminary comparison of the photosensitizing properties of porphyrins in aqueous solution and liposomal systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 160, 181-192.

Srivastava P., Singh K., Verma M., Sivakumar S., Patra A.K. (2018) Photoactive platinum(II) complexes of nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen: Interaction with biological targets, antioxidant activity and cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 144, 243-254.

Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Cirman T., Snipas S.J., y col. (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *Journal of Biological Chemistry* 276(5), 3149-3157.

Strickley R.G. (2004) Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmacological Research* 21, 201-230.

Sutherland R.M., Inch W.R., McCredie J.A., Kruuv J. (1970) A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 18, 491-495.

Sutherland R.M., McCredie J.A., Inch W.R. (1971) Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 46, 113-120.

Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports* 7, 880-885.

Szokalska A., Makowski M., Nowis D., Wilczyński G.M., Kujawa M., Wójcik C., y col. (2009) Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of ER stress and unfolded protein response. *Cancer Research* 69(10), 4235-4243.

Szymańska J.A., Bruchajzer E., Sporny S. (1996) Comparison of Hepatotoxicity of 1,2-, 1,3- and 1,4-Dibromobenzenes: the Dynamics of Changes of Selected Parameters of Liver Necrosis in Acute Poisoning in Mice. *Journal of Applied Toxicology* 16(1), 35-41.

Tabas I., Ron D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* 13(3), 184-190.

Tait S.W.G., Ichim G., Green D.R. (2014) Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science* 127(10), 2135-2144.

Talmadge J.E., Singh R.K., Fidler I.J., Raz A. (2007) Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *American Journal of Pathology* 170, 793-804.

Tan C., Lu Y., Ji L., Mao Z. (2014) Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. *Metallomics* 6, 978.

Taquet J.P., Frochot C., Manneville V., Barberi-Heyob M. (2007) Phthalocyanines covantly bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry* 14, 1673-1687.

Teratani T., Quinn G., Yamamoto Y., Sato T., Yamanokuchi H., Asar A., y col. (2005) Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplantation* 14(9), 629-635.

Testa U., Pelosi E., Castelli G. (2018) Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences* 6, e31.

Thomas T., Thomas T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 244-258.

Tong R., Cheng J. (2007) Anticancer polymeric nanomedicines. *Polymer Reviews* 47, 345-381.

Tong Z.S., Miao P.T., Liu T.T., Jia Y.S., Liu X.D. (2012) Enhanced antitumor effects of BPD-MA-mediated photodynamic therapy combined with adriamycin on breast cancer in mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 33, 1319-1324.

Torchilin V.P. (2007) Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research* 24, 1-16.

Torisawa Y.S., Takagi A., Shiku H. (2005) A multicellular spheroid-based drug sensitivity test by scanning electrochemical microscopy. *Oncology Reports* 13(6), 1107-1112.

Toyota H., Yanase N., Yoshimoto T., Moriyama M., Sudo T., Mizuguchi J. (2003) Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Letters* 189, 221-230.

Tu P., Huang Q., Ou Y., Du X., Li K., Tao Y., y col. (2016) Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 through the ROS/JNK signaling pathway. *Oncology Reports* 35, 3209-3215.

Valastyan S., Weinberg R.A. (2011) Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147(2), 275-292.

Valcárcel M., Arteta B., Jaureguibeitia A., Lopategi A., Martínez I., Mendoza L., y col. (2008) Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *Journal of Translational Medicine* 6, 57.

van der Veen N., van Leengoed H.L.L.M., Star W.M. (1994) In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin: increased damage after multiple irradiations. *British Journal of Cancer* 70, 867-872.

van Hoogevest P., Wendel A. (2014) The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116, 1088-1107.

van Nostrum C.F. (2004) Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 9-16.

van Straten D., Mashayekhi V., de Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. (2017) Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* 18, 9(2).

van Zuylen L., Verweij J., Sparreboom A. (2001) Role for formulation vehicles in taxane pharmacology. *Investigational New Drugs* 19, 125-141.

Vicente M.G. (2001) Porphyrin-based Sensitizers in the Detection and Treatment of Cancer: Recent Progress. *Current Medicinal Chemistry - Anti-cancer Agents* 1, 175-194.

Victor B.C., Anbalagan A., Mohamed M.M., Sloane B.F., Cavallo-Medved D. (2011) Inhibition of Cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion. *Breast Cancer Research* 13(6), R115.

Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., y col. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine* 319, 525-532.

von Tappeiner H., Jesionek A. (1903) Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 50, 2042-2044.

Wang H., Zhang H.M., Yin H.J., Wei M.Q., Sha H., Liu T.J., y col. (2015) Combination of a novel photosensitizer DTPP with 650 nm laser results in efficient apoptosis, arresting cell cycle and cytoskeleton protein changes in lung cancer A549 cells. *Lasers in Medical Science* 30, 77-82.

Wang K., Zhang Y., Wang J., Yuan A., Sun M., Wu J., y col. (2016) Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. *Scientific Reports* 6(6), 27421.

.

Wang S., Hüttmann G., Rudnitski F., Diddens-Tschoeke H., Zhang Z., Rahmanzadeh R. (2016) Indocyanine green as effective antibody conjugate for intracellular molecular targeted photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics* 1 (21,7), 78001.

Wang W., Kandimalla R., Huang H., Zhu L., Li Y., Gao F., y col. (2018) Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. *Seminars in Cancer Biology* S1044-579X(17)30222-5.

Wei M., Chen M., Chen K., Lou P., Lin S.Y., Hung S., y col. (2014) Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* 10(7), 1179-1192.

Weinberg R.A. (2007) The Biology of Cancer. *Garland Sciences*.

Weitzel J.N., Blazer K.R., MacDonald D.J., Culver J.O., Offit K. (2011) Genetics, genomics,

and cancer risk assessment: state of the art and future directions in the era of personalized medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(5), 327-359.

West C.M.L., Moore J.V. (1992) Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochemistry and Photobiology* 55(3), 425-430.

Willett W.C. (2001a) Diet and breast cancer. *Journal of Internal Medicine* 249, 395-411.

Willett W.C. (2001b) Diet and cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 10, 3-8.

Wood D.E., Thomas A., Devi L.A., Berman Y., Beavis R.C., Reed J.C., y col. (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17, 1069-1078.

Woodle M.C., Matthey K.K., Newman M.S., Hidayat J.E., Collins L.R., Redemann C., y col. (1992) Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1113, 171-199.

World Health Organization, 2018 (<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).

Wu D., Liu Z., Fu Y., Zhang Y., Tang N., Wang Q. y col. (2013) Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells. *Oncology Letters* 6, 1111-1119.

Wu N.Z., Da D., Rudoll T.L., Needham D., Whorton A.R., Dewhirst M.W. (1993) Increased Microvascular Permeability Contributes to Preferential Accumulation of Stealth Liposomes in Tumor Tissue. *Cancer Research* 53, 3765-3770.

Xia L., Kong X., Liu X., Tu L., Zhang Y., Chang Y., y col. (2014) An upconversion nanoparticle - Zinc phthalocyanine based nanophotosensitizer for photodynamic therapy. *Biomaterials* 35, 4146-4156.

Yamashima T. (2016) Can 'calpain-cathepsin hypothesis' explain Alzheimer neuronal death? *Ageing Research Reviews* 32, 169-179.

Yan M., Zhu W., Zheng X., Li Y., Tang L., Lu B., y col. (2016) Effect of glutamate on lysosomal membrane permeabilization in primary cultured cortical neurons. *Molecular Medicine Reports* 13, 2499-2505.

Yanase N., Takada E., Yoshihama I., Ikegami H., Mizuguchi J., y col. (1998) Participation of Bax-alpha in IFN-alpha-mediated apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18, 855-861.

Yang G., Yang T., Zhang W., Lu M., Ma X., Xiang G. (2014) In Vitro and in Vivo Antitumor Effects of Folate-Targeted Ursolic Acid Stealth Liposome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(10), 2207-2215.

Yang H.B., Hsu P.I., Chan S.H., Lee J.C., Shin J.S., Chow N.H. (1996) Growth kinetics of colorectal adenoma-carcinoma sequence: an immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Human Pathology* 10, 1071-1076.

Yang Y., Zhao S., Song J. (2004) Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(2), 223-234.

Yang Y.M., Ren L., Wang H.J. (2017) Strategies in the design of gold nanoparticles for intracellular targeting: opportunities and challenges. *Therapeutic Delivery* 8, 879-898.

Yi G., Hong S.H., Son J., Yoo J., Park C., Choi Y., y col. (2018) Recent advances in nanoparticle carriers for photodynamic therapy. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* 8(4), 433-443.

Yokoyama M. (2010) Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required considerations for clinical trials. *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(2),145-158.

Yoo J., Lim Y., Kim Y., Ha K. (2011) Differential Cytotoxic Responses to Low- and High-Dose Photodynamic Therapy in Human Gastric and Bladder Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 3061-3071.

Yslas E.I., Prucca C., Romaninia S., Durantini E.N., Bertuzzia M., Rivarola V. (2009) Biodistribution and phototherapeutic properties of Zinc (II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine in vivo. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 6, 62-70.

Yu H., Guo P., Xie X., Wang Y., Chen G. (2017) Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21(4), 648-657.

Zamani A.R.N., Mashayekhi M.R., Jadid M.F.S., Faridvand Y., Tajalli H., Rahbarghazi R. (2018) Photo-modulation of zinc phthalocyanine-treated breast cancer cell line ZR-75-1 inhibited the normal tumor activity in vitro. *Lasers in Medical Science* Aug 24, 1-10.

Zhan Q., Yue W., Hu S. (2011) Effect of photodynamic therapy and endostatin on human glioma xenografts in nude mice. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 8, 314-320.

Zhang J., Jianga C., Figueiró Longo J.P., Azevedo R.B., Zhanga H., Muehlmann L.A. (2018) An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8(2),137-146.

Zhang M., Murakami T., Ajima K., Tsuchida K., Sandanayaka A.S.D., Ito O., y col. (2008) Fabrication of ZnPc/protein nanohorns for double photodynamic and hyperthermic cancer phototherapy. *PNAS* 39, 14773-14778.

Zhang Y., Sun T., Jiang C. (2018) Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 8(1), 34-50.

Zhao C., Wang M., Cheng A., Yang Q., Wu Y., Zhu D., y col. (2019) Programmed cell death: the battlefield between the host and alpha-herpesviruses and a potential avenue for cancer treatment. *Oncotarget* 9(55), 30704-30719.

Zheng S., El-Naggar A.K., Kim E.S., Kurie J.M., Lozano G. (2007) A genetic mouse model for metastatic lung cancer with gender differences in survival. *Oncogene* 26, 6896-6904.

Zuchowska A., Jastrzebska E., Chudy M., Dybko A., Brzozka Z. (2017) 3D lung spheroid cultures for evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures in microfluidic Lab-on-a-Chip system. *Analytica Chimica Acta* 990, 110-120.